

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Dottorato di Ricerca in

“Riproduzione Sviluppo e Accrescimento dell’Uomo”

XXI CICLO

Coordinatore

Prof. C. Pignata

Tesi di Dottorato

Carcinoma dell’endometrio: nuovi fattori eziopatogenetici

Tutore

Prof. Costantino Di Carlo

Candidato

Dott.ssa Cinzia Ferrara

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

INDICE

Introduzione pag 3

- Carcinoma dell'endometrio: aspetti generali pag 5
- Carcinoma dell'endometrio: fattori etiopatogenetici

pag 27

- Carcinoma dell'endometrio: COX2 e β catenina

pag 32

I linea di ricerca:“Valutazione dell'espressione di COX 2
nel carcinoma dell'endometrio di tipo 1. Correlazione con
parametri clinico-patologici

- Scopo della ricerca pag 41
- Materiali e Metodi pag 41
- Risultati pag 49

II linea di ricerca:“Valutazione dell'espressione di β catenina
nel carcinoma dell'endometrio, nella iperplasia endometriale e
nell'endometrio normale.

- Scopo della ricerca pag 52
- Materiali e metodi pag 52
- Risultati pag 60

DISCUSSIONE pag 62

BIBLIOGRAFIA pag 66

INTRODUZIONE

Il carcinoma dell'endometrio costituisce attualmente la neoplasia emergente nel mondo occidentale, rappresentando l'8-10% di tutte le neoplasie femminili. Parallelamente si è osservata una diminuzione del carcinoma invasivo della cervice, tanto che in molti paesi industrializzati la frequenza delle suddette neoplasie mostra una tendenza a divenire sovrapponibile. In Italia, l'incidenza del carcinoma endometriale è pari al 5-6% dei tumori femminili con circa 4000 nuovi casi annui.

Anche i tassi di mortalità più recenti mostrano significative variazioni : negli Stati Uniti nel 1998 sono stati registrati 36100 nuovi casi con 6300 decessi attribuiti al carcinoma dell'endometrio. Se si paragonano questi dati con quelli del decennio precedente, se ne evince che, a quasi parità di incidenza , le morti sono più che duplicate (2900 decessi registrati nel 1987). Ciò obbliga a considerare più criticamente la nostra condotta clinica in termini di screening, diagnosi,

staging e protocolli terapeutici. Uno screening per il carcinoma dell'endometrio non è di nessun provato vantaggio.

Il Pap-test non è utilizzabile; va osservato tuttavia che la presenza di cellule endometriali nel Pap-test di una donna in post menopausa che non faccia uso di terapia sostitutiva, rappresenta un evento del tutto anomalo che richiede accertamenti ulteriori.

Carcinoma dell'endometrio: aspetti generali

Oggi, il carcinoma dell'endometrio è per frequenza al settimo posto tra tutte le neoplasie del mondo dopo la mammella, cervice, colon-retto, polmone, stomaco e ovaio.(1) Nei paesi occidentali il carcinoma dell'endometrio si riscontra più frequentemente in età post-menopausale, con incidenza massima tra i 55 ed i 65 anni.

Tuttavia il 30% dei casi viene diagnosticato prima della menopausa e il 5% prima dei 40 anni.(2)

Mentre il tasso di mortalità ha avuto un decremento di circa il 60% a partire dagli anni '50, l'incidenza ha mostrato un marcato incremento all'inizio degli anni '70. A partire dagli anni '80 tale incidenza è rimasta stabile.(2) Tale dato può essere messo in relazione all'aumento dell'età media della popolazione dei paesi sviluppati che ha condotto ad un notevole incremento di nuovi casi e di morti per carcinoma dell'endometrio ogni anno.

Esiste comunque una notevole differenza in termini di incidenza tra i vari paesi. Un alto tasso si osserva nei paesi ad elevato tenore di vita quali Europa, Regno Unito, USA, Canada, Nuova Zelanda e Australia. Un tasso considerevolmente basso si osserva invece in Africa, Sud America e Asia. C'è inoltre differenza nell'ambito dello stesso gruppo razziale che vive in regioni diverse. Il tasso di incidenza, ad esempio, nelle donne bianche ed in quelle asiatiche

che vivono negli USA è molto più alto rispetto alle donne della stessa razza che però vive in altri paesi.(2) Le differenze razziali e geografiche suggeriscono che l'insorgenza del carcinoma dell'endometrio è influenzata dal patrimonio genetico e dai fattori ambientali.

Cullen nel 1900, fu il primo che descrisse l'associazione tra iperplasia endometriale e carcinoma e da allora, numerosi studi hanno confermato questa relazione.

Evidenze istopatologiche e molecolari suggeriscono l'esistenza di due diversi tipi di carcinoma dell'endometrio.

Un primo tipo, più frequente, generalmente conseguente ad iperplasia endometriale, (3,4) interessa donne relativamente più giovani, con le caratteristiche stimate dell'iperestrogenismo (Tabella 1); nella maggior parte dei casi presenta un istotipo favorevole (adenocarcinoma endometriode) (Tabella2).

Tabella 1: *Classificazione dell'iperplasia endometriale*

| Tipo di iperplasia | Progressione al carcinoma (%) |
|--|--------------------------------------|
| Semplice (cistica senza atipie) | 1 |
| Complessa (adenomatosa senza atipie) | 3 |
| Atipica <ul style="list-style-type: none">• Semplice (cistica con atipica)• Complessa (adenomatosa con atipica) | 8 29 |

Un secondo tipo, invece, generalmente associato ad endometrio atrofico, interessa donne di età più avanzata e presenta istotipi più aggressivi (siero-papillare, a cellule chiare, carcinoma adenosquamoso) (Tabella 2).(4)

Tabella 2: *Classificazione Istologica del Carcinoma Endometriale*

| |
|---|
| Adenocarcinoma Endometrioidale (75-80%) |
| Carcinoma Siero-Papillare (<10%) |
| Carcinoma a cellule chiare (4%) |
| Carcinoma Mucinoso (1%) |
| Carcinoma squamoso (<1%) |
| Carcinoma misto (10%) |

L'adenocarcinoma endometrioides è l'istotipo più frequente. Per lo più si riscontra in forme abbastanza ben differenziate, con ghiandole tubulari rivestite da cellule stratificate contenenti scarsa mucina. Nei casi più differenziati questa forma è distinguibile con difficoltà dalla iperplasia endometriale atipica severa. I caratteri di elevata differenziazione e la morfologia delle papille (*variante villoghiandolare*) permettono di distinguere questa variante a buona prognosi dal *carcinoma siero-papillifero* che è a prognosi nettamente più sfavorevole. Nella *variante secretiva* nel citoplasma delle cellule sono presenti vacuoli ripieni di una sostanza ricca di glicogeno, simili a quelli che si riscontrano nelle cellule endometriali nella fase secretiva del ciclo mestruale. Tale variante è per lo più a prognosi favorevole, è particolarmente frequente nelle donne più giovani e va distinta dal carcinoma a cellule chiare che ha prognosi più infausta.

La *variante a cellule ciliate* è piuttosto rara e grossolanamente non differisce da un comune carcinoma endometriale di tipo endometrioides. Essa viene per lo più rilevata in donne che hanno fatto uso in precedenza di estrogeni, ed è a prognosi favorevole.

Per quanto riguarda la *variante con differenziazione squamosa* (carcinoma adenosquamoso), va precisato che aree di differenziazione squamosa sono reperibili in circa il 25% dei casi.

Essa non va confusa con il carcinoma endometriale a cellule squamose, che è caratteristico dell'età senile, a comportamento aggressivo e prognosi molto sfavorevole.

L'adenocarcinoma mucinoso presenta molti punti di somiglianza con il carcinoma mucinoso dell'ovaio e dell'endocervice. Questo tumore si differenzia da quello a cellule chiare e dall'endometrioide secretivo perché è molto più ricco di mucina e più povero di glicogeno. Mentre è molto raro come forma pura di carcinoma endometriale, è piuttosto frequente (5% del totale dei casi) come aspetto istologico dominante. La sua prognosi non differisce da quella dell'adenocarcinoma endometrioide.

Il carcinoma sieroso segue per frequenza l'istotipo endometrioide con le sue varianti: costituisce infatti il 10% del totale dei carcinomi endometriali e si riscontra soprattutto in età avanzata, in donne in post menopausa che non presentano un clima iperestrogenico, in genere magre e pluripare. La diagnosi viene effettuata spesso in stadi avanzati. La neoplasia presenta *un'architettura papillifera* (carcinoma siero-papillifero) con cellule fortemente atipiche e pleiomorfe che rivestono un ampio peduncolo vascolare. Il carcinoma sieroso assume di solito un aspetto vegetante e tende ad infiltrare il miometrio precocemente e ad invadere gli spazi linfovascolari. Il che rende ragione della

prognosi estremamente sfavorevole, anche per i casi nei quali, almeno inizialmente, il tumore è confinato in una formazione polipoide. Nell'aspetto istologico, questa neoplasia ricorda gli omonimi carcinomi ovarici con presenza di corpi psammomatosi.

Il *carcinoma a cellule chiare* è piuttosto raro (1-5%), di origine paramesonefrica piuttosto che paramesonefrica, del tutto simile istologicamente all'adenocarcinoma a cellule chiare dell'ovaio, ma anche a quello della cervice e della vagina. Questa neoplasia presenta in genere un elevato grado di atipie e tende ad invadere precocemente gli spazi linfoghiandolari, per cui ha prognosi estremamente sfavorevole.

Il *carcinoma squamoso* è molto raro (2-7%) ed è caratteristico dell'età senile avanzata. E' dotato di malignità molto elevata ed è spesso associato a stenosi cervicale, espressione forse di metaplasma squamosa tipica dell'epitelio cilindrico endocervicale.

L'istotipo indifferenziato comprende un piccolo gruppo di neoplasie la cui differenziazione è così scarsa da non consentire l'inquadramento in nessuno degli istotipi precedentemente descritti.

I *carcinomi di tipo misto* sono caratterizzati dalla presenza di almeno due tipi cellulari, ciascuno dei quali deve rappresentare più del 10% della neoplasia. E' probabile che la prognosi dipenda dalla

componente meno favorevole, anche se ciò non è stato ancora provato con certezza.

La differenziazione dell'adenocarcinoma dell'endometrio è valutata in tre gradi istopatologici:

- *Grado1(G1)* : ben differenziato con il 95% o più di struttura ghiandolari e/o papillari.
- *Grado2(G2)* : moderatamente differenziato.
- *Grado3(G3)* : con aree solide superiori al 50% o completamente indifferenziato.

Il grado di differenziazione correla con l'infiltrazione miometriale: più il tumore è indifferenziato, maggiormente infila la parete uterina.

E' chiaro che lo stile di vita ed i fattori endocrini rappresentano fattori di rischio solo per il primo tipo ma non per il secondo, per il quale l'unico fattore di rischio importante sembra essere l'età avanzata.(3,4)

I fattori di rischio per cancro dell'endometrio sono riassunti nella Tabella 3.

Tabella 3: *Fattori di rischio per il Carcinoma Endometriale*

| |
|---|
| Età |
| Menarca precoce |
| Menopausa tardiva |
| Nulliparità |
| Infertilità |
| Irregolarità mestruali (menorragia, menometrorragia) |
| Anovularietà cronica |
| Disfunzione ovarica (PCOS) |
| Esposizione sbilanciata ad estrogeni esogeni |
| Terapia con tamoxifene |
| Tumori della teca e della granulosa |
| Anamnesi positiva per Ca mammario (BRCA1/BRCA2) o del colon (HNPCC) |
| Obesità |
| Diabete mellito |
| Ipertensione arteriosa con o senza coronaropatie |
| Fumo |

Molti studi hanno dimostrato che l'età precoce del menarca ed una età tardiva della menopausa così come le anomalie del ciclo sono positivamente correlati con il rischio di insorgenza di carcinoma endometriale.

La nulliparità aumenta il rischio di carcinoma endometriale di due-tre volte e tale rischio, invece, diminuisce con l'aumentare del

numero di figli.(7) Inoltre condizioni associate ad infertilità ed in particolare la PCOS, possono predisporre al carcinoma dell'endometrio.(8,9)

Il ruolo della terapia ormonale sostitutiva nella patogenesi del cancro dell'endometrio è controverso. I primi casi di donne con carcinoma dell'endometrio che praticavano terapia ormonale sostitutiva con estrogeni risalgono agli inizi degli anni '60.(10) Da allora, quasi tutti gli studi caso-controllo e di coorte hanno dimostrato una stretta correlazione tra terapia ormonale sostitutiva e carcinoma dell'endometrio.

Una metanalisi che combinava sia studi caso-controllo che di coorte ha dimostrato un rischio relativo di carcinoma dell'endometrio di 2.3 (95% intervallo di confidenza 2.1- 2.5) in donne che avevano sempre assunto estrogeni rispetto a donne che non ne avevano mai assunto .(11)

Tale rischio inoltre aumenta con la durata dell'assunzione di estrogeni.(12)

In sintesi, il rischio relativo stimato suggerisce un aumento del rischio di carcinoma dell'endometrio di circa il 40% se la terapia estrogenica viene effettuata per un anno, o meno; al contrario, tale rischio aumenta fino a 10 volte dopo dieci o più anni di terapia.(11)

Il rischio, inoltre, aumenta con l'aumento della dose di estrogeni : un aumento solo moderato del rischio è stato osservato, infatti, in donne che assumevano basse dosi di estrogeni (per esempio 0,3 mg /die).(13)

Tuttavia, alcuni studi dimostrano che l'entità del rischio diminuisce dopo la sospensione della terapia estrogenica,(14) pur persistendo per alcuni anni .(15)

I dati suggeriscono infatti che il rischio di carcinoma dell'endometrio rimane ancora moderatamente elevato anche dopo 2-5 anni dalla sospensione della terapia estrogenica.(11)

La somministrazione ciclica di progesterone (a partire dal 10° giorno di ogni ciclo di trattamento) sembra ridurre la continua stimolazione mitotica dell'endometrio indotta dalla sola somministrazione di estrogeni.

Il progesterone infatti antagonizza gli effetti degli estrogeni riducendo i recettori estrogenici e aumentando l'attività degli enzimi che metabolizzano l'estradiolo in metaboliti meno potenti.(16) Un recente studio randomizzato controllato su 47 donne in trattamento combinato con estrogeni e progesterone ha dimostrato che il rischio di carcinoma dell'endometrio non aumenta,almeno apparentemente .(17)

Il fatto che l'uso di contraccettivo orali (estrogeni più progestinico) riduca il rischio di carcinoma dell'endometrio è stato ampiamente dimostrato.(7,18)

L'uso a lungo termine di contraccettivi orali combinati sembra ridurre ulteriormente questo rischio (18), e l'effetto protettivo dura per 20 o più anni dopo la sospensione (18) . I risultati di alcuni studi,(18) suggeriscono che l'effetto protettivo dei contraccettivi orali è indipendente dal dosaggio di progestinico .(19)

Il rischio, infatti, è simile a prescindere che il contenuto di progestinico sia alto o basso.(20)

Molti studi hanno dimostrato che una massa corporea elevata, e l'obesità in particolare, è correlata ad un incremento del rischio di carcinoma endometriale .(21)

Il rischio relativo associato con l'obesità è compreso in un range di 2 – 10.

E' stato anche dimostrato che la distribuzione centrale del grasso corporeo è più importante del grasso periferico e che il rischio aumenta significativamente con l'aumentare delle misure di adiposità centrale, dopo aver corretto per la BMI.(22) E' stato altresì suggerito che l'associazione tra una massa corporea elevata ed il cancro endometriale è maggiore nelle donne in postmenopausa .(23)

L'associazione con l'obesità è biologicamente plausibile. Infatti donne obese in postmenopausa, rispetto a donne magre, presentano elevati livelli endogeni di estrogeni a causa dell'aromatizzazione a livello del tessuto adiposo degli androgeni surrenalici (androstenedione), la cui produzione è ulteriormente stimolata da una condizione di iperinsulinemia, frequentemente presente in questi soggetti.(25)

L'obesità è inoltre associata con ridotti livelli di sex hormone.binding globulin(SHBG),(26) determinando un aumento della quota di estrogeni disponibili.

Diversi studi hanno dimostrato che donne che hanno sempre fumato hanno un rischio ridotto di carcinoma dell'endometrio (27,28) , sebbene questo dato riguardi esclusivamente le donne in postmenopausa (28,29) .

Il rischio relativo associato alle donne che hanno sempre fumato è compreso tra 0.2-0.9. Non vi sono dati definitivi derivanti dal confronto tra fumatrici ed ex-fumatrici (30) . Gli effetti protettivi del fumo sono direttamente correlati al numero di sigarette fumate e agli anni.(28)

La riduzione del rischio di carcinoma dell'endometrio dimostrerebbe l'attività antiestrogenica del fumo. A conferma di ciò vi sono dati che mostrano che nelle donne fumatrici l'età della

menopausa è più precoce e che il rischio di osteoporosi e di frattura dell'anca è più elevato.(31)

Inoltre è stato dimostrato che il fumo di sigaretta influenza anche l'associazione di altri fattori di rischio per il carcinoma dell'endometrio come ad esempio l'uso di estrogeni nelle donne obese.(32,33)

Una dieta ricca in grassi e povera di carboidrati complessi e fibre è associata ad un aumentato rischio di carcinoma dell'endometrio.(21) E' stato dimostrato che nonostante questi tipi di dieta siano associati con un'elevata massa corporea, l'associazione persiste anche dopo aver corretto per la BMI ed altri fattori di rischio. (21) Al contrario una dieta ricca in frutta e verdure o ricca in carotene è associata ad un significativo decremento del rischio di carcinoma dell'endometrio.(21,34)

Un elevato consumo di alcool appare correlato ad un incremento dei livelli di estrogeni (35) , anche se non vi sono risultati che mostrano un'associazione tra consumo di alcool e carcinoma dell'endometrio (34,36,37,38) .

Un'intensa attività fisica riduce i livelli sierici di estrogeni (39) . Alcuni studi hanno dimostrato che la vita sedentaria aumenta il rischio di carcinoma dell'endometrio anche dopo aver corretto per la BMI e l'introito calorico (37,40) .

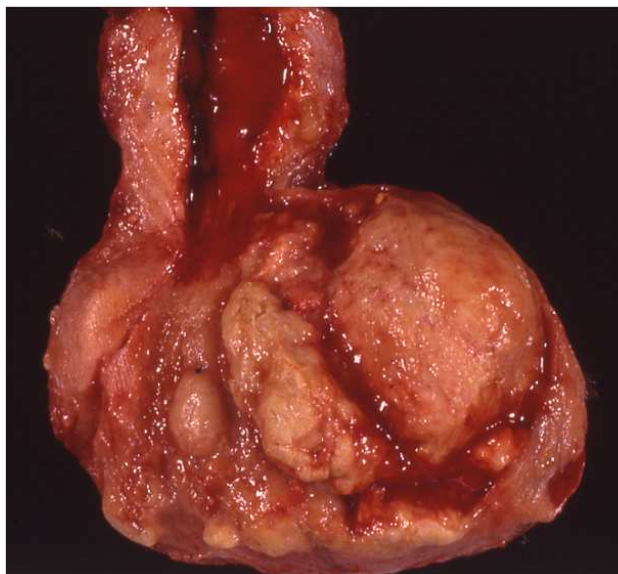
La forma meglio documentata di carcinoma endometriale familiare si manifesta come parte della sindrome di Lynch II, che identifica un sottogruppo di carcinomi colon-rettali non polipoidi ereditari, nella quale il carcinoma del colon-retto, dell'endometrio, della mammella e delle ovaie sono ereditati in maniera autosomica dominante. Le basi molecolari di questa sindrome sono rappresentate da mutazioni a carico dei geni (MSH2, Mlh1) deputati alla riparazione dei danni a carico del DNA cellulare. Le donne appartenenti a famiglie nelle quali si riscontra questa sindrome presentano nel corso della loro vita un aumento del rischio di sviluppare un carcinoma dell'endometrio del 20-30%.(41)

Inizialmente utilizzato come terapia palliativa negli stadi avanzati, il tamoxifene oggi rappresenta il più importante farmaco ormonale per il trattamento del carcinoma della mammella a tutti gli stadi. Nel 1996 l'American College of Obstetricians and Gynecologists ha stabilito che l'uso del tamoxifene aumenta il RR di carcinoma dell'endometrio e che questo aumento è dose e durata dipendente.(42)

Il carcinoma endometriale può insorgere in qualsiasi punto della cavità uterina e microscopicamente può presentarsi sotto due forme: circoscritto e diffusa.(48)

La forma circoscritta appare di solito come una formazione polipoide, più raramente come un'ulcerazione o un rilievo nodulare limitato ad una precisa area endometriale. Questa proliferazione, a differenza dei polipi endometriali benigni, è irregolare, friabile con aspetti necrotici e / o emorragici spesso molto accentuati.

Fig.1: *Esame macroscopico di utero con neoplasia endometriale*



La forma diffusa può arrivare ad occupare l'intera cavità uterina, può rappresentare l'espansione della diffusione locale di una forma inizialmente localizzata al terzo superiore della cavità uterina per lo più sul fondo, oppure essere legata ad un'origine multicentrica del tumore.

Dal punto di vista macroscopico, l'utero, di solito, presenta un volume aumentato ed una consistenza diminuita, ma può essere anche del tutto normale. Spesso, associato al carcinoma endometriale, si possono riscontrare altre patologie: miomi, adenomiosi, endometriosi pelvica.

La diffusione del carcinoma endometriale avviene prevalentemente per estensione diretta, verso il miometrio e verso il canale cervicale.

Data la lenta crescita del tumore, è rara l'estensione agli altri organi pelvici (vescica, retto), mentre non è infrequente l'interessamento metastatico alle ovaie che principalmente avviene attraverso il drenaggio linfatico della parete tubarica o direttamente, per colonizzazione in tale sede, di cellule neoplastiche esfoliate dal tumore e disseminate attraverso il lume tubarico.

Il grado di infiltrazione miometriale costituisce uno degli elementi più importanti nel condizionare la prognosi. Con il progredire dell'infiltrazione neoplastica verso la sierosa del viscere si è evidenziata, infatti, sia una parallela riduzione della sopravvivenza al quinto anno sia una maggiore incidenza di metastasi linfonodali.

Ciò rende necessaria una precisa definizione del grado di infiltrazione miometriale al fine di programmare, nei casi a rischio, una terapia adiuvante.

L'estensione diretta al canale cervicale rappresenta una via di diffusione relativamente frequente (circa il 20% dei casi). Essa assume un ruolo prognostico sfavorevole in quanto può condizionare :

- La diffusione attraverso la ricca rete linfatica propria della cervice uterina.
- La diffusione, per via linfatica o per estensione diretta, alle strutture parametriali.
- La diffusione vaginale.

Il drenaggio linfatico del corpo dell'utero avviene primariamente lungo il decorso dei vasi ovarici; ciò spiega come le sedi metastatiche più frequenti siano a livello iliaco esterno, aortico, cavale, lombare.

I vasi linfatici, così come avviene per il sistema ematico, costituiscono delle reti anastomotiche tra i due segmenti uterini, superiore e inferiore, per cui neoplasie a sede o con estensione bassa possono dare ripetizioni linfonodali anche attraverso la rete paracervicale. Da segnalare inoltre la possibile via di diffusione ai

linfatici inguinali attraverso i vasi decorrenti nel legamento rotondo.

La disseminazione per via ematogena, al contrario, è rara ed è ad appannaggio quasi esclusivo di stadi avanzati di malattia. Gli organi più frequentemente colpiti in tale evenienza sono: fegato, polmoni, ossa e cervello.

L'importanza della determinazione della effettiva estensione della neoplasia ai fini di una pianificazione terapeutica ottimale ha indotto la Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia (FIGO) (52) a introdurre nel 1988 una nuova procedura di stadiazione chirurgica del carcinoma dell'endometrio, in sostituzione della modalità di stadiazione clinico-strumentale in uso, la cui adeguatezza è stata d'altra parte ampiamente dimostrata.

Tabella 4: *Stadiazione Chirurgica FIGO per il Cancro Endometriale, 1988*

| Stadio | Descrizione |
|---|---|
| Stadio I: il carcinoma è confinato al corpo luteo, incluso l'istmo | |
| Ia | Tumore limitato all'endometrio |
| Ib | Invasione di meno della metà dello spessore endometriale |
| Ic | Invasione oltre la metà dello spessore miometriale |
| Stadio II: il carcinoma ha coinvolto il corpo e la cervice ma non è esteso fuori dall'utero | |
| IIa | Coinvolgimento solo delle ghiandole cervicali |
| IIb | Invasione dello stroma della cervice |
| Stadio III: il carcinoma è esteso fuori dall'utero ma è confinato alla pelvi | |
| IIIa | Il tumore invade la sierosa e/o gli annessi e/o citologia peritoneale positiva |
| IIIb | Metastasi vaginali |
| IIIc | Metastasi ai linfonodi pelvici e/o para-aortici |
| Stadio IV: il carcinoma ha interessato la mucosa della vescica o del retto o ha metastasi a distanza | |
| IVa | Invasione tumorale della mucosa vescicolare e/o dell'intestino |
| IVb | Metastasi a distanza incluse quelle intra-addominali e/o ai linfonodi inguinali |

Secondo l'American College of Obstetricians and Gynecologist, allo stato attuale, non vi sono indagini diagnostiche non invasive, sufficientemente sensibili e specifiche, da utilizzare per lo screening di pazienti con carcinoma endometriale asintomatico. Tuttavia è possibile identificare una popolazione maggiormente a rischio da sottoporre a prevenzione secondaria, anche se nel 50% dei casi il tumore insorge in pazienti senza apparenti fattori di rischio.

La citologia cervico-vaginale ha una bassa sensibilità per la diagnosi di neoplasie dell'endometrio. La sua attendibilità varia, secondo le diverse casistiche, dal 20 al 60%. Il riscontro di cellule endometriali normali nel Pap-test di donne in postmenopausa è nella maggioranza dei casi senza significato clinico .(47)

La valutazione citologica endometriale non trova indicazione nella paziente asintomatica. Sono state introdotte diverse metodiche di prelievo citologico endometriale, per ridurre i fallimenti. Lo Jet-wash consiste in un lavaggio della cavità endometriale e quindi in un esame delle cellule asportate; l'endocyte si basa su un'asta di plastica, con due alette, che ruotata raccoglie le cellule della cavità endometriale. L'accuratezza diagnostica per la malignità è elevata (70-90%), ma non ancora sufficiente per individuare i cosiddetti precursori della neoplasia endometriale come le iperplasie (65%).

Prima dell'introduzione dell'isteroscopia, l'accertamento diagnostico si basava sull'esame istologico del materiale asportato con il curettage della cavità uterina o con prelievo con cannula di Novak.

Entrambe le metodiche sono eseguite a "cielo coperto" e quindi in entrambi i casi possono sfuggire lesioni focali; in più il curettage è gravato da un'incidenza di falsi negativi che oscilla tra il 10 ed il 20% mentre il prelievo con cannula di Novak ha una bassa sensibilità per la iperplasia atipica (64%).

L'isteroscopia consente una visione panoramica del canale cervicale e della cavità endometriale; permette di valutare la topografia e l'estensione della lesione, e quindi la visualizzazione di lesioni focali che con le precedenti tecniche potevano sfuggire. Offre quindi la possibilità di eseguire una biopsia mirata oltre che un'adeguata valutazione del canale cervicale, rappresentando attualmente la metodica di prima scelta in pazienti con sospetto ecografico di neoplasia uterina.

L'ecografia rappresenta l'indagine di prima scelta nella diagnostica delle perdite ematiche anormali, consentendo uno studio accurato della rima endometriale.

In postmenopausa il rilievo di un endometrio ispessito può essere riscontrato in presenza di polipi, iperplasia endometriale e

carcinomi del corpo dell'utero. Se lo spessore dell'endometrio è < 4mm, il rischio di iperplasia è minimo e non dovrebbero essere praticate indagini invasive; il rischio infatti di falsi negativi, in base a questo limite, è inferiore all'1%. Tale metodica quindi, deve essere utilizzata per selezionare le pazienti da sottoporre ad una diagnostica di secondo livello.

Nelle pazienti sintomatiche in postmenopausa, l'esame ecografico da solo non può sostituire l'isteroscopia poiché vi è la possibilità che la neoplasia insorga su endometrio atrofico.

L'ecografia transvaginale svolge anche un ruolo significativo nella valutazione della invasione del miometrio, raggiungendo un'accuratezza diagnostica dell'87%.

La valutazione preoperatoria dell'infiltrazione miometriale, dell'invasione cervicale e dell'eventuale interessamento linfonodale nel carcinoma dell'endometrio svolge un ruolo importante per un corretto approccio chirurgico.

La validità della RMN nella diagnostica del carcinoma dell'endometrio rispetto alla valutazione ultrasonografica ed alla Tc è ormai consolidata; in particolare quest'ultima metodica non sembra mostrare la stessa affidabilità nella valutazione dell'infiltrazione miometriale, soprattutto nelle pazienti più anziane con miometrio atrofico.

Attualmente non vi sono marcatori tumorali sierici trasferibili nella pratica clinica che ci consentano una diagnosi precoce.

I livelli di CA 125 sierico sembrano essere significativamente elevati in pazienti con linfonodi positivi o infiltrazione miometriale profonda. Nel follow -up un aumento di tale marcatore potrebbe essere indice di ripresa di malattia in particolare negli istotipi siero- papilliferi. Tuttavia livelli elevati di CA125 possono riscontrarsi anche in pazienti sottoposte a radioterapia senza presenza di recidive.

Carcinoma dell'endometrio: Fattori etiopatogenetici

Per quanto riguarda il meccanismo etiopatogenetico che provoca la serie di trasformazioni che portano in ultima analisi al carcinoma dell'endometrio, è noto che una prevalenza estrogenica a livello endometriale determina un aumento dell'attività mitotica che, a sua volta, rende più probabili mutazioni cancerose (attivazione di oncogeni, inattivazione di geni tumore-soppressori), responsabili alla fine della trasformazione maligna dell'endometrio. In questo senso gli estrogeni sembrano agire più promuovendo la formazione del tumore che non come carcinogeni in senso stretto.

Di recente (43) è stato ipotizzato che l'estradiolo esplichi oltre ad una attività mitotica, anche una debole azione in senso carcinogeno e mutageno capace di indurre lesioni genetiche a bassa frequenza. Secondo questa ipotesi le alterazioni tumorali iniziali potrebbero essere provocate dalla conversione metabolica dell'estradiolo a 4 idrossi estradiolo che verrebbe successivamente attivato in un prodotto intermedio reattivo semiquinone-quinone capace di danneggiare il DNA cellulare. Il tumore si svilupperebbe quindi dall'ulteriore proliferazione di queste cellule danneggiate mediata dalla presenza del recettore ormonale.

Mentre risultano inoppugnabili le prove che legano l'origine del carcinoma dell'endometrio di tipo 1 alla iperplasia atipica di lunga durata, gli eventi cellulari molecolari che trasformano l'iperplasia atipica in carcinoma endometriale sono tuttora sconosciuti.

Sembrerebbe che le mutazioni puntiformi a carico dell'oncogene K ras, identificate sia nel carcinoma dell'endometrio (10%-30%) che nell'iperplasia endometriale, possano rappresentare eventi precoci nello sviluppo del carcinoma dell'endometrio.

Un'aumentata espressione dell'oncogene erb-2/neu è stata riscontrata nel 10-15% di carcinoma dell'endometrio di tipo 1.(44)

Al contrario la rarità delle mutazioni della proteina p53 nel carcinoma dell'endometrio di tipo 1 e la loro assenza

nell'iperplasia endometriale atipica sembrerebbero suggerire che le mutazioni della p53 non siano coinvolte nella trasformazione della iperplasia endometriale atipica in carcinoma endometriale.(45)

Dal momento che la conversione di quest'ultima in carcinoma richiede sicuramente mutazioni multiple, la persistenza di una normale funzione della p53 in queste lesioni può spiegare perché lo sviluppo del carcinoma dell'endometrio di tipo 1 sia lento rispetto a quello di tipo sieroso non endometriode nel quale la perdita della funzione di p53 è un evento precoce.

Anche PTEN sembrerebbe essere coinvolta nei meccanismi di carcinogenesi del carcinoma dell'endometrio.

La inattivazione dell'anti oncogene PTEN infatti rappresenta il più comune difetto genetico nel carcinoma dell'endometrio; tale inattivazione viene osservata in più del 83% dei tumori.

PTEN è una fosfatasi che agisce in opposizione a PI3K, una chinasi che fosforila AKT attivandola. AKT fosforilata , a sua volta, favorisce la proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare e l'inibizione dell'apoptosi.

Mutazioni della Beta- catenina sono state osservate nel 25%-38% dei carcinomi endometriali di tipo I. La beta-catenina è una componente del sistema E-caderina- catenina ,fondamentale per la

differenziazione cellulare e per il mantenimento della normale architettura tissutale, e gioca un ruolo importante nella trasduzione del segnale. L'aumento dei livelli nucleari di Beta- catenina produce l'attivazione di geni che attivano la proliferazione cellulare (LEF/Tcf). La mutazione della beta-catenina potrebbe rappresentare un primo step della carcinogenesi del carcinoma endometriale. In analogia al carcinoma del colon, più geni potrebbero essere potenziati dalla disregolazione del pathway della beta- catenina.

Altro ruolo importante nella progressione tumorale nel cancro dell'endometrio potrebbe essere assolto dall'incremento delle COX2. E' stato già recentemente dimostrato che i livelli di questo enzima risultano aumentati anche in altre neoplasie quali cancro del colon, della prostata ecc. Nel cancro del colon ad esempio, è noto che l'aumentata espressione di COX2 gioca un ruolo importante nella progressione neoplastica. Infatti somministrando inibitori di COX2 a pazienti con mutazione di APC (FAP) o a topi knockout per APC si blocca la progressione da adenoma a neoplasia e si riduce il numero di adenomi .Le COX 2, enzimi responsabili della sintesi delle prostaglandine, potrebbero potenziare, in analogia a quanto dimostrato per il carcinoma del colon, il pathway della Beta- catenina. Infatti , il legame delle

prostaglandine al proprio recettore transmembrana determina un cambiamento conformazionale che attiva il complesso delle G protein. L'attivazione della subunità α del complesso delle G protein determina il sequestro di Axina, una proteina fondamentale per la inattivazione della beta-catenina.

In definitiva si può quindi ipotizzare nel caso del carcinoma dell'endometrio di tipo 1 una eziopatogenesi secondo la quale le neoplasia si sviluppa lentamente a partire da precursori (endometrio iperplastico per effetto della stimolazione estrogenica), che vanno incontro a mutazioni multiple e manifestano un grado sempre più elevato di atipie architettoniche e citologiche.

In questa visione si ritiene che la conservazione della funzione della p53 possa inibire una rapida espansione clonale delle cellule mutate e quindi spiegare la lentezza dello sviluppo del tumore.

Dal punto di vista eziologico i carcinomi dell'endometrio tipo 2 non presentano alcuna relazione, contrariamente a quanto avviene per il carcinoma endometriale di tipo 1, con una iperstimolazione estrogenica comunque verificatasi (esogena o endogena). In queste pazienti i livelli ematici di estrogeni ed androgeni sono del tutto simili a quelli misurabili nei controlli, mentre risultano elevate le

concentrazioni ematiche di SHBG, la proteina che riduce la quota biologicamente attiva degli estrogeni.

I soli fattori di rischio che oggi possono essere proposti per questo tipo di carcinoma endometriale sono l'età e l'esposizione a radiazioni della pelvi.(46) Sia l'età che l'irradiazione pelvica potrebbero agire determinando nelle cellule endometriali un sempre maggior numero di mutazioni capaci di portare alla trasformazione maligna dell'endometrio. Nelle pazienti particolarmente anziane potrebbe inoltre giocare un ruolo la diminuzione dei poteri immunitari.

Carcinoma dell'endometrio: COX 2 e β Catenina

Nel corso degli ultimi anni, la ricerca scientifica si è ampiamente soffermata sui meccanismi molecolari coinvolti nell'etiopatogenesi del cancro dell'endometrio. In alcuni studi è stato sottolineato il ruolo della overespressione di COX2 nei tumori della sfera genitale femminile.

In particolare si è osservato che COX 2 è overespressa nell'iperplasia endometriale e nel carcinoma dell'endometrio rispetto all'endometrio normale.

La cicloossigenasi (COX) è un enzima responsabile della sintesi delle prostaglandine (PGs) a partire dall'acido arachidonico. (Fig 2).

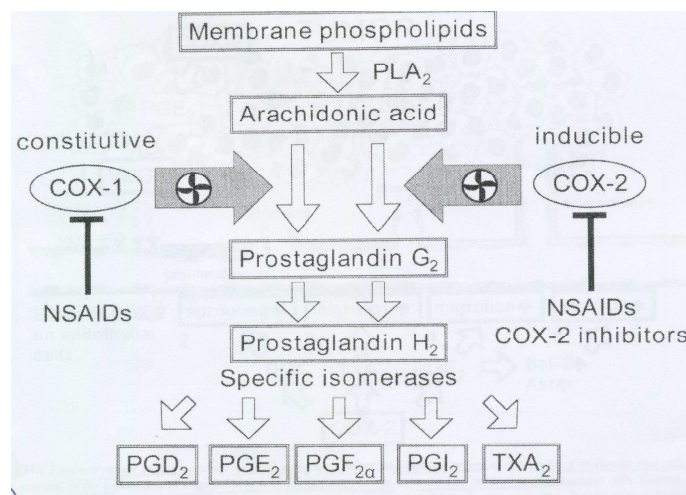


Fig 2 L'acido arachidonico è rilasciato dalla membrana fosfolipidica dalla fosfolipasiA2 (PLA2) ed è metabolizzato dalla ciclossigenasi (COX) in prostaglandine H2 (PGH2) in due steps. Le PGH2 sono convertite in eicosanoidi da specifiche isomerasi. Abbreviazioni; PG, prostaglandine, TXA2 trombassano A2.

Sono state identificate 2 isoforme di cicloossigenasi: COX 1 e COX 2.(54)

COX1 è espressa costituzionalmente in molti tessuti ed è coinvolta nei meccanismi di citoprotezione della mucosa gastrica e di aggregazione piastrinica.

Al contrario COX2 è un enzima inducibile che è up regolato da vari stimoli tra cui citochine, fattori di crescita e promotori tumorali.

Nei tessuti normali COX2 non è espressa, al contrario essa è costituzionalmente espressa in vari tumori maligni, in particolare nei tumori del tratto gastrointestinale.

Studi recenti hanno dimostrato che la overespressione di COX 2 è correlata con la progressione della malattia e con una prognosi peggiore, suggerendo che le COX2 giocano un ruolo importante nello sviluppo del cancro e delle metastasi.

In aggiunta a questi dati, vi sono evidenze cliniche ed epidemiologiche in base alle quali l'aspirina e altri farmaci antinfiammatori non steroidei inibiscono i fattori di crescita per le cellule tumorali.

In alcuni studi è stato sottolineato il ruolo dell'overespressione di COX2 nei tumori della sfera genitale femminile.

La overespressione di COX 2 sarebbe infatti associata ad una prognosi infausta nelle pazienti con carcinoma della cervice.

COX2 inoltre sarebbe overespressa nell'iperplasia e nel carcinoma dell'endometrio rispetto all'endometrio normale.

Non è ancora ben chiaro in che modo le COX2 intervengano nella eziopatogenesi del cancro dell'endometrio né se l'overespressione di questo enzima possa essere correlato alle caratteristiche clinico-patologiche di questa neoplasia (stadio, istotipo, grading, grado di invasione miometriale, coinvolgimento linfonodale).

Alcuni dati in letteratura (54) evidenziano un ruolo di COX2 nel promuovere l'angiogenesi (Fig.3) e nell'inibire l'apoptosi incrementando i livelli di bcl2 (Fig 4).

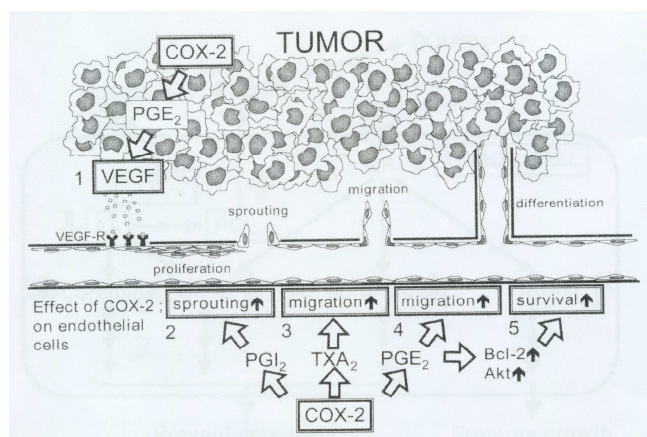


Fig. 3 COX2 promuove l'angiogenesi tumorale attraverso differenti pathways. L'angiogenesi si verifica in seguito ad una cascata di eventi. Il processo inizia con la produzione da parte del tumore di fattori di crescita angiogenetici e di cellule infiammatorie. I fattori di crescita legano i recettori presenti sulla membrana delle cellule endoteliali delle venule preesistenti attivando pathways di traduzione de segnale. Le cellule endoteliali proliferanti secernono proteasi che degradano la membrana basale vascolare, a ciò fa seguito la "nascita" di nuovi vasi (sprouting). Le Prostaglandine E2 (PGE2) stimolano i fattori di crescita endoteliale (VEGF). Le prostaglandine I2 (PGI2) regolano lo "sprouting"

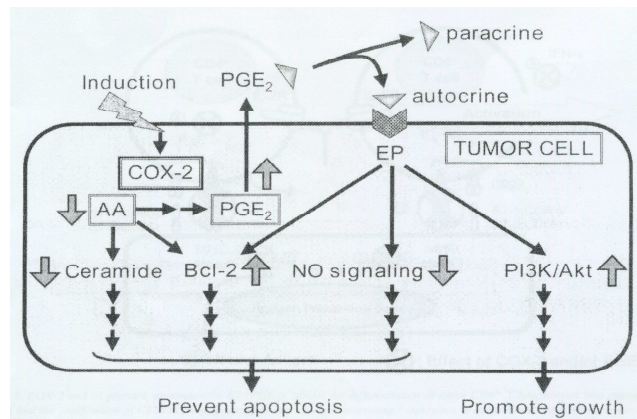


Fig.4 COX2 inibiscono l'apoptosi e promuovono la crescita cellulare. L'induzione di COX2 aumenta la produzione di Prostaglandine E2 (PGE2) a partire dall'acido arachidonico;ciò,determina l'attivazione dei recettori (EP) per le PGE 2 con conseguente aumento dell'espressione di bcl2.

Nel 25%-38% dei carcinomi endometriali di tipo I sono state osservate mutazioni della β -catenina.(55)

β -catenina è una proteina ubiquitaria citoplasmatica ed è una componente del sistema catenina-caderina , essenziale per la differenziazione cellulare e per il mantenimento della normale architettura tissutale.(55)

Tale proteina gioca un ruolo importante nei meccanismi di trasduzione del segnale e nella attivazione della trascrizione attraverso la formazione di complessi con proteine DNA-binding.

L'aumento dei livelli nucleari di β -catenina sarebbe responsabile dell'attivazione di alcuni geni coinvolti nella proliferazione cellulare(LEF/tcf).

La proteina APC down regola i livelli di β -catenina.

Tale proteina infatti, crea un complesso ternario con Axina e GSK-3 β che fosforila β -catenina e ne determina la degradazione attraverso un proteasoma ubiquitina dipendente (Fig 5).

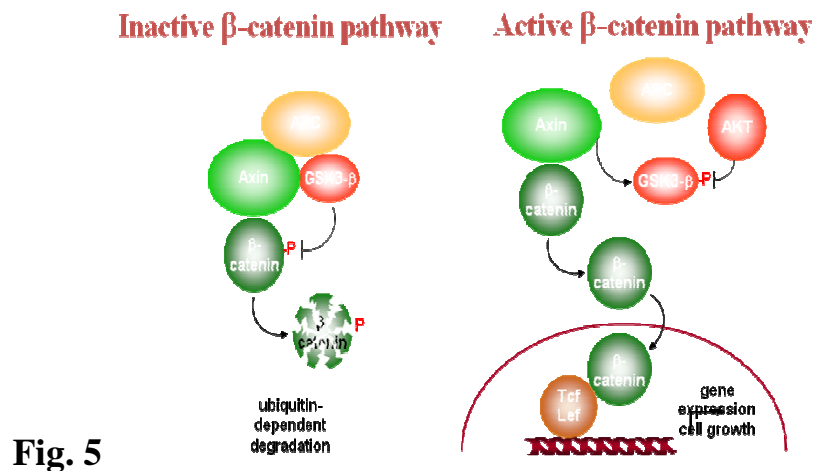


Fig. 5

In alcuni tumori, ed in particolare nel cancro del colon, è stato dimostrato che l' inattivazione del gene APC è responsabile dell'attivazione costitutiva di β -catenina , ciò si traduce in un aumento di β -catenina beta a livello nucleare con attivazione incontrollata di geni coinvolti nella proliferazione cellulare e conseguentemente un incontrollata progressione tumorale.

Alcuni dati in letteratura evidenziano che in una percentuale che varia dal 25 %al 38% di carcinomi endometri ali, vi è una mutazione di β -catenina.

Nell'endometrio normale l'espressione di β -catenina così come quello di E caderina è prevalente nella fase proliferativa del ciclo rispetto a quella secretiva.(56)

Nel cancro dell'endometrio l'espressione di β -catenina di membrana e di E caderina diminuiscono rispetto all'endometrio normale in fase proliferativa.

Inoltre l'espressione di tale proteina si riduce ulteriormente nei tumori ad alto grado rispetto a quelli di basso grado.

Al contrario l'espressione nucleare di β -catenina è stata osservata sia nell'endometrio normale in fase proliferativa sia nei tumori endometri ali di alto grado.

Da alcuni dati (56) inoltre è emerso che l'espressione nucleare di β -catenina è associata ad una minore espressione di E caderina in particolare nei tumori di alto grado.

I linea di ricerca:“Valutazione dell’espressione di COX 2 nel carcinoma dell’endometrio di tipo 1. Correlazione con parametri clinico-patologici”.

Scopo della ricerca

Il principale obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l’incremento dell’espressione di COX2 nel carcinoma dell’endometrio e di valutare se tale incremento poteva essere correlato in maniera significativa alle caratteristiche clinico-patologiche (istotipo, stadio, grading, grado di invasione miometriale) di tale neoplasia.

MATERIALI E METODI

Pazienti

a) Gruppo di studio

E’ costituito da 75 donne con diagnosi istologica di carcinoma dell’endometrio. Le principali caratteristiche di queste pazienti sono riassunte nella tabella 5

Tabella 5: *Caratteristiche delle pazienti*

| | |
|---|-------|
| ETA' <anni> (media±DS) | 58 |
| PESO <kg> (media±DS) | 66.8 |
| ALTEZZA <cm> (media±DS) | 162.3 |
| ETA' DEL MENARCA (anni) (media±DS) | 11 |
| PARITA' | 2 |
| FUMO | 25 |
| IPERTENSIONE | 11 |
| DIABETE | 10 |

La diagnosi istologica era stata fatta su campioni di biopsia isteroscopica e confermata successivamente da esame istologico su pezzo operatorio.

Le 75 pazienti con carcinoma endometriale sono state sottoposte ad isterectomia totale o radicale per via laparotomia con annessiectomia bilaterale. A tutte è stato praticato un washing peritoneale.

E' stata praticata linfadenectomia pelvica e paraortica sistematica in 23 pazienti (30.3%) ad alto rischio (grado di invasione

miometriale > 50%, coinvolgimento della cervice, istotipi speciali)
in accordo con i protocolli clinici nazionali.

Un sampling linfonodale è stato effettuato in 7 pazienti che presentavano linfonodi macroscopicamente palpabili.

Delle 75 pazienti con carcinoma dell'endometrio 50 erano allo Stadio I, 12 allo Stadio II, 11 allo Stadio III e 2 allo Stadio IV.

La maggior parte dei tumori erano carcinomi di tipo endometriode (94%).

Le caratteristiche clinico-patologiche sono riportate nella tabella 3.

b) Gruppo di controllo

Il nostro gruppo di controllo è costituito da 85 pazienti (età media: 55aa) con diagnosi istologica di patologia endometriale benigna. Le caratteristiche principali delle pazienti sono riportate nella tabella 6.

Tabella 6: *Caratteristiche del gruppo di controllo*

| | |
|---|-----|
| ETA' <anni> (media±DS) | 55 |
| PESO <kg> (media±DS) | 65 |
| ALTEZZA <cm> (media±DS) | 163 |
| ETA' DEL MENARCA (anni) (media±DS) | 11 |
| PARITA' | 2 |
| FUMO | 27 |
| IPERTENSIONE | 6 |
| DIABETE | 5 |

Criteri di esclusione

Sono state escluse pazienti con storia di radioterapia pelvica, pazienti che facevano uso di antinfiammatori non steroidei, pazienti in trattamento ormonale in atto o nell'anno immediatamente precedente.

INTERVENTI

-Immunoistochimica

I campioni di tessuto sono stati ottenuti da biopsia su pezzo operatorio nelle pazienti con carcinoma dell'endometrio e da biopsia isteroscopica per il gruppo di controllo.

I campioni sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina in accordo con le procedure standard.

Sezioni di 4 micron di porzioni rappresentative di ogni caso sono state deparaffinizzate in xylene, reidratate, trattate con 0.3% di H_2O_2 in metanolo per 10 minuti per bloccare l'attività perossidasi endogena, e soggette a recupero degli epitopi con induzione di calore in forno a microonde utilizzando la ChemMate detection kit (Dako, Glostrup, Denmark) in accordo con le istruzioni del fornitore. Le sezioni di tutti i casi studiati sono state processate simultaneamente per immunoistochimica su sistema automatizzato TechMate Horizon (Dako) utilizzando il kit di perossidasi Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La biotina endogena è stata saturata mediante il kit di bloccaggio-biotina (Vector). Le sezioni sono state poste in

incubazione con siero normale di coniglio per 15 minuti e dopo con antisiero policlonale di coniglio contro la COX-2 umana (Cayman, Ann Arbor) diluito a 1:300 per un'ora. I controlli negativi sono stati effettuati utilizzando siero di coniglio non immunizzato. I controlli positivi noti sono stati sempre eseguiti durante la procedura.

Quantificazione immunoistochimica

I campioni sono stati analizzati senza conoscere in precedenza le caratteristiche cliniche e biologiche.

E' stato assegnato un punteggio alle cellule marcate. La conta cellulare nei tumori è stata effettuata scegliendo cinque 20x campi da ogni sezione di tessuto così da rappresentare al meglio la marcatura immunoistochimica del campione del tessuto sul vetrino.

I campi sono stati acquisiti con una fotocamera digitale Nikon Coolpix 950.

Entrambe le cellule immunomarcate e negative sono state contate su una griglia di 0.0225 mm^2 .

La conta delle cellule è stata effettuata due volte per ogni immagine digitale muovendo la griglia sopra le aree rappresentative. La percentuale di cellule immunomarcate è stata calcolata con una conta cellulare media di due aree della griglia per cinque 20 x campi.

L'analisi statistica dei dati è attualmente in corso.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule con l'RNeasy Kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK) e sottoposto a digestione su colonna con il RNasi free DNasi set (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK). La qualità dell'RNA è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% e visualizzazione con colorazione all'etidio bromuro. I cDNA sono stati ottenuti partendo da 2 µg di RNA totale utilizzando *random primers* in 50 µl di volume di reazione utilizzando il Gene Amp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). Le successive amplificazioni sono state effettuate utilizzando 2,5 µl di prodotto di retrotrascrizione in un volume di reazione di 25 µl come

suggerito dal produttore. I livelli di trascritti di β -actina sono stati utilizzati come controllo.

Le reazioni di PCR quantitativa sono state effettuate utilizzando la SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) nel sistema iCycler (Bio-Rad, Munich, Germany). Le reazioni di amplificazione (volume di reazione finale 25 μ l) contenevano ciascun primer in concentrazione 200 nM, MgCl₂ 3mM, dNTPs 300 μ M, SYBR-Green PCR buffer 1 \times , AmpliTaq Gold DNA Polymerase 0.1 U/ μ l, 0.01 U/ μ l Amp Erase, acqua RNasi-free e 2 μ l cDNA. Le condizioni di cycling termico sono state le seguenti: un primo ciclo di 2 min a 50°C, un ciclo di 10 min a 95°C e 40 cicli costituiti da 15 sec di denaturazione a 95°C seguiti da 1 min di appaiamento ed estensione a 60°C. Per verificare l'assenza di prodotti aspecifici sono stati eseguiti 80 cicli di *melting* (55°C per 10 sec). In tutti i casi le curve di *melting* hanno confermato che era stato generato un solo e specifico prodotto. L'amplificazione è stata seguita misurando l'aumento di fluorescenza causato dal legame del SYBR-Green al DNA. I cicli-soglia di fluorescenza sono stati misurati in triplicato e le variazioni di espressione

genica sono state calcolate tramite la formula: $2^{-(\Delta Ct_{\text{campione1}} - \Delta Ct_{\text{campione2}})}$, dove ΔCt rappresenta la differenza tra i cicli-soglia dell'mRNA oggetto di studio e quelli dell'mRNA di β -actina. I primers sono stati disegnati con il programma Primer 3 (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e sintetizzati da MWG biotech (Ebersberg, Germany).

RISULTATI

Immunoistochimica COX2

Della 75 pazienti con carcinoma dell'endometrio 29 (38.6%) presentavano un'aumentata espressione di COX2;

Del gruppo di controllo (85 pazienti con patologia endometriale benigna) 50 pazienti presentavano endometrio normale e 35 pazienti presentavano iperplasia. Delle 50 pazienti con endometrio normale 2 (1%) presentavano un'aumentata espressione di COX2, delle 35 pazienti con iperplasia 7 (20%) presentavano aumentata espressione di COX2.

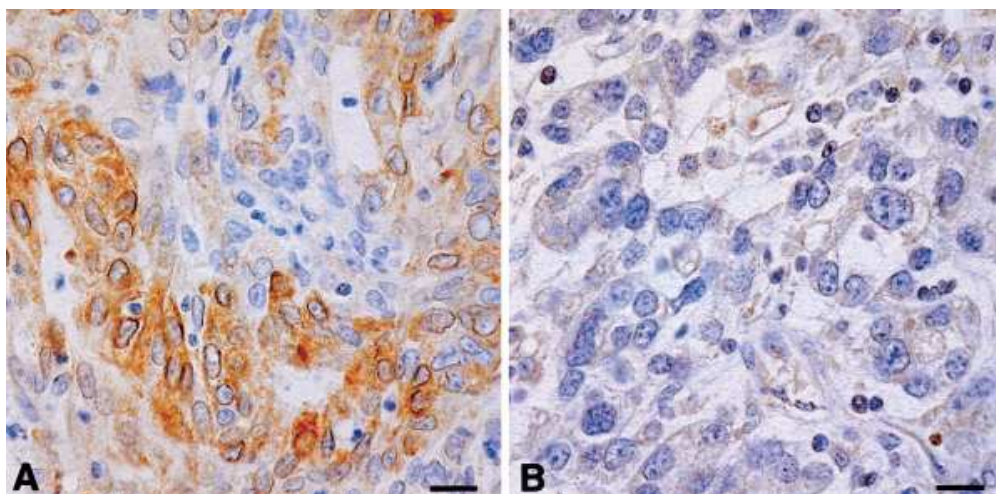


FIGURA 6. Immunoistochimica Cyclooossigenasi-2 (COX-2) nel carcinoma dell'endometrio. (A) Le cellule tumorali mostrano un'intensa positività citoplasmatica a COX2. (B) Cellule non tumorali negative a COX2

La positività di COX2 era più elevata nei carcinomi endometriali con coinvolgimento della cervice o con estensione extrauterina (57%) rispetto a quelli limitati al corpo dell'utero (30.1%).

La positività a COX2 aumentava dal Grado I (16%) al Grado II (42%) al Grado III (60%).

Inoltre in base al grado di invasione miometriale la positività a COX2 era maggiore (67%) nelle pazienti con invasione miometriale maggiore del 50% rispetto a quelle che presentavano invasione miometriale inferiore al 50% (16%). Non è stata

osservata nessuna correlazione significativa nè con lo stadio nè con il coinvolgimento linfonodale.

La tabella 7 mostra la positività di COX2, come percentuale di cellule immunomarcate per COX2, in accordo con le caratteristiche clinico-patologiche di tutta la popolazione in esame. La positività di COX non mostra una differente distribuzione in base all'età.

Tabella 7

| Characteristics | No. of Patients | COX-2 positive No. (%) |
|--------------------------------|-----------------|-------------------------|
| All cases | 75 | 29(38.6%) |
| Age (yrs) | | |
| ≤ 60 | 33 | |
| > 60 | 42 | |
| FIGO stage | | |
| I | 50 | 14 (28.0%)* |
| II | 12 | 10 (83.0%) |
| III | 11 | 5 (45.0%) |
| IV | 2 | 1 (50%) |
| Histotype | | |
| Endometrioid | 70 | 27 (38%) |
| Serous | 5 | 3 (60.9%) |
| Grade | | |
| 1 | 24 | 4 (16.0%) |
| 2 | 26 | 11 (42.0%) |
| 3 | 25 | 15 (60.0%) [°] |
| Outer half myometrial invasion | | |
| No | 37 | 6 (16.0%) |
| Yes | 28 | 19 (67.0%) |
| Lymph node status | | |
| Negative | 30 | 15 (50.0%) |
| Positive | 10 | 5 (50.0%) |

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

* p <0.05 vs Stage II, III, IV

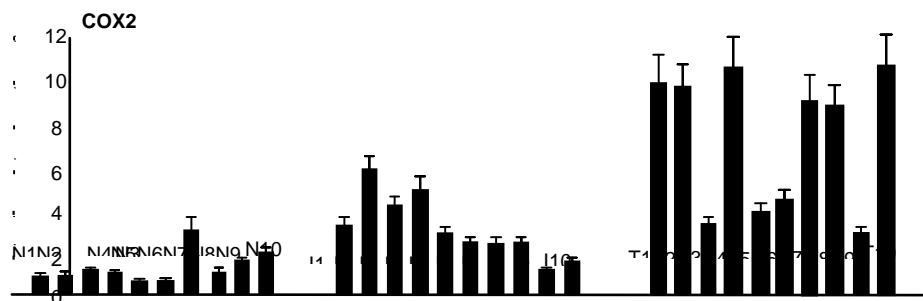
[°] p <0.05 vs Grade I and II

PCR COX2

L'espressione di COX 2 è stata valutata anche mediante PCR quantitativa.

L'espressione di COX2 è risultata significativamente più alta nelle pazienti con carcinoma dell'endometrio rispetto a quelle del gruppo di controllo.

Relative expression
(fold increase)



Espressione di RNA di COX2, valutato tramite PCR quantitativa, in tessuti normali, iperplasie e tumori

Role of Cyclooxygenase-2 in Endometrial Carcinoma: Correlation with Clinicopathologic Parameters

Ferrara C*, Di Carlo C*, Castellone M[§], Insabato L[•], Nappi C*

* Department of Obstetrics and Gynecology, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

[°] Biomorphological and Functional Sciences, Pathology Section,
University of

Naples "Federico II", Naples, Italy.

§

Correspondence to: Costantino Di Carlo, Department of Gynecology and Obstetrics, and Pathophysiology of Human Reproduction, University of Naples "Federico II", Via Pansini 5, Naples, Italy. Tel/fax: +39 0817462905, e-mail: costantino.dicarlo@unina.it

ABSTRACT

BACKGROUND. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is overexpressed in endometrial hyperplasia and carcinoma, but no data have been reported until now about the expression of COX-2 and its possible clinical significance in endometrial carcinoma. We investigated by immunohistochemistry the expression of COX-2 in a single institutional series of primary untreated endometrial carcinoma patients.

METHODS. The study was conducted on 75 primary untreated endometrial carcinoma patients who were admitted to the Department of Obstetrics and Gynecology, Federico II University of Naples. Immunohistochemistry was performed by using rabbit polyclonal antiserum against human COX-2.

RESULTS. Twenty-nine patients (38.6%) were scored as COX-2 positive. COX-2 positivity was higher (57%) in endometrial carcinoma with cervical or extrauterine involvement than in tumors limited to the corpus (30%). COX-2 positivity increased from Grade 1 (16%) to Grade 2 (42%) to Grade 3 (60%) endometrial carcinoma. Interestingly, considering early International Federation of Gynecology and Obstetrics stage patients ($n = 65$), the percentage of COX-2 positivity was higher in patients with deep myometrial invasion (67%) than in patients without or less than 50% myometrial invasion (16%).

CONCLUSIONS. COX-2 is expressed in a high percentage of a large series of primary endometrial tumors and its expression may be associated closely with parameters of tumor aggressiveness. The possible prognostic role of COX-2 in endometrial carcinoma deserves further study. *Cancer* 2002;95:801–7.

© 2002 American Cancer Society.

DOI 10.1002/cncr.10736

KEYWORDS: cyclooxygenase-2, endometrial carcinoma, prognostic factors, clinical outcome, treatment modalities.

Endometrial adenocarcinoma is the most frequent malignancy of the female genital tract in developed countries and represents the seventh leading cause of cancer-related death in women.¹ Currently, International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage, depth of myometrial invasion, and grade of differentiation are used to predict clinical outcome and to plan treatment modalities for patients with endometrial carcinoma.² However, none of these parameters are accurate predictors, considering that 10% of Stage I and 17% of Stage II patients experience recurrence³ and eventually die of the disease. In this context, the assessment of abnormalities in the expression of biologic factors more strictly related to tumor cell biology and intrinsic aggressiveness provide useful information to select individualized treatment. In particular, p53 mutations in patients with endometrial carcinoma are associated with more aggressive histotypes like serous and clear cell carcinomas.⁴ Loss of inhibitors of cell cycle, like p130, are independently associated with poor prognosis in endometrial carcinoma patients.⁵ We also reported that microsatellite instability (MI), which reflects deficiencies in mismatch repair genes, is an independent predictor of recurrence in patients with early-stage endometrial tumors.⁶ Several factors support a molecular and pathologic distinction between tumors with and without MI and suggest that these biologically different tumors may exhibit a different clinical outcome.^{6,7}

Much attention has been focused on the involvement of cyclooxygenase (COX), the key enzyme in the conversion of arachidonic acid

to prostaglandins, in the critical steps of tumor onset and progression. Two COX isoforms have been characterized. COX-1, which is expressed constitutively in almost all tissues, serves homeostatic functions, whereas COX-2, which is highly inducible by growth factors, prostaglandins, and tumor promoters, plays a key role in the inflammatory response.⁸ Several in vitro and preclinical studies showed that COX-2 overexpression in human cancer cells is associated with apoptosis inhibition, increased adhesion to the extracellular matrix, metastatic potential, and neoangiogenesis.⁹⁻¹¹ In addition, COX-2 may impair host immune responses as suggested by the ability of COX-2 inhibitors or COX-2 antisense constructs to revert tumor-induced immunosuppression.¹²

COX-2 is overexpressed in the majority of colorectal carcinomas and in other solid tumors and is associated with the clinicopathologic parameters of aggressiveness and unfavorable prognosis.¹³⁻¹⁶ In addition, reduced COX-2 expression has been reported in gastrointestinal tumors with defective mismatch repair systems,^{17,18} leading to the hypothesis that MI tumors may lack a signal important for constitutive COX-2 induction.¹⁷

COX-2 overexpression is a strong predictor of chemotherapy response and is associated with an unfavorable outcome in cervical carcinoma patients.¹⁶ COX-2 is overexpressed in endometrial hyperplasia and carcinoma^{19,20} compared with expression in the normal endometrium. To our knowledge, no data have been reported until now about the expression of

COX-2 and its possible clinical significance in a large series of patients with endometrial carcinoma.

The aim of this study was to investigate by immunohistochemistry the expression of COX-2 and its association with clinicopathologic features and clinical outcome in a single institutional series of primary untreated endometrial carcinoma patients. We also analyzed the relationship between COX-2 expression and MI status.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study included 75 primary untreated endometrial carcinoma patients who were admitted, treated, and followed-up at the Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Gynecologic Oncology, Federico II University of Naples. Staging was performed according to the 1988 FIGO classification.² Median age was 62 years (range, 30–84). Of these patients, 62 had Stage I–II and 13 had Stage III–IV disease. Most of the tumors (93%) were endometrioid adenocarcinomas and varied from well (32%) through moderate (35%) to undifferentiated (33%). The other clinicopathologic characteristics are listed in Table 1.

All patients underwent a total abdominal or modified radical hysterectomy plus bilateral salpingo-oophorectomy. At the time of laparotomy, fluid samples were obtained for cytologic examination and thorough intraabdominal and pelvic exploration with biopsy or removal of

any suspicious lesion was performed. Complete cytoreduction was achieved in patients with advanced disease. Systematic pelvic and paraaortic lymphadenectomy was performed in 20 (30%) high-risk patients (deep myometrial invasion, cervical involvement, special histotypes) according to a national randomized clinical protocol. Lymph node sampling was performed in six patients because of visible or palpable enlarged lymph nodes. High-risk patients underwent external radiotherapy or four to six cycles of cisplatinbased (each cycle: 50–75 mg/m²) chemotherapy 2–3 weeks after primary surgery. After completing treatment, patients were followed by gynecologic examination, transvaginal/abdominopelvic ultrasonography, and radiologic investigations, if necessary, every 4 months for the first 2 years, every 6 months from the third to the fifth year, and yearly thereafter.

Immunohistochemistry

Tumor tissue biopsies were obtained at first surgery in all cases. Tissue specimens were fixed in formalin and paraffin embedded according to standard procedures. Four-micronsections of representative blocks from each case were deparaffinized in xylene, rehydrated, treated with 0.3% H₂O₂ in methanol for 10 minutes to block endogenous peroxidase activity, and subjected to heat induced epitope retrieval in a microwave oven using the ChemMate detection kit (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. Slides from all cases studied were processed simultaneously for immunohistochemistry on the TechMate Horizon

automated staining system (Dako) using the Vectastain ABC peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Endogenous biotin was saturated by a biotin blocking kit (Vector). Sections were incubated with normal rabbit serum for 15 minutes and then with rabbit polyclonal antiserum against human COX 2 (Cayman, Ann Arbor, MI) diluted 1:300 for 1 hour. Negative controls were performed using non immunized rabbit serum. Known positive controls were always run in the assay.

| Characteristics | No. of Patients | COX-2 positive No. (%) |
|---|-----------------|-------------------------|
| All cases | 75 | 29 (38.6%) |
| Age (yrs) | | |
| ≤ 60 | 33 | |
| > 60 | 42 | |
| FIGO stage | | |
| I | 50 | 14 (28.0%)* |
| II | 12 | 10 (83.0%) |
| III | 11 | 5 (45.0%) |
| IV | 2 | 1 (50%) |
| Histotype | | |
| Endometrioid | 70 | 27 (38%) |
| Serous | 5 | 3 (60.9%) |
| Grade | | |
| 1 | 24 | 4 (16.0%) |
| 2 | 26 | 11 (42.0%) |
| 3 | 25 | 15 (60.0%) [°] |
| Outer half myometrial invasion | | |
| No | 37 | 6 (16.0%) |
| Yes | 28 | 19 (67.0%) |
| Lymph node status | | |
| Negative | 30 | 15 (50.0%) |
| Positive | 10 | 5 (50.0%) |
| FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics | | |

* p <0.05 vs Stage II, III, IV

[°] p <0.05 vs Grade I and II

Quantification of Immunohistochemical Staining

The tissue analyzed sections without previous knowledge of the clinical and biologic parameters. Scoring was assigned according to the proportion of cells stained. Cell count in the tumor was performed by choosing five 20x fields from each tissue section so as to best reflect the overall immunostaining of the tissue specimen on the slide. The files, acquired with a Nikon Coolpix 950 digital camera (Nikon Instruments), were opened in Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA) using a Macintosh G3 workstation (Apple, Cupertino, CA). Both immunostained and negative cells within a superimposed grid of 0.0225 mm² were counted. Cell counts were performed twice for each digital image by moving the grid over representative areas. The percentage of immunostained cells was calculated by averaging cell counts from two grid areas from five 20x fields. The results were reported as mean \pm SE. Sections with greater than 5% stained tumor cells, corresponding to the median value, were positive. In case of disagreement ($n = 8$, 12%), sections were submitted to a rejoin evaluation by a multiheaded microscope.

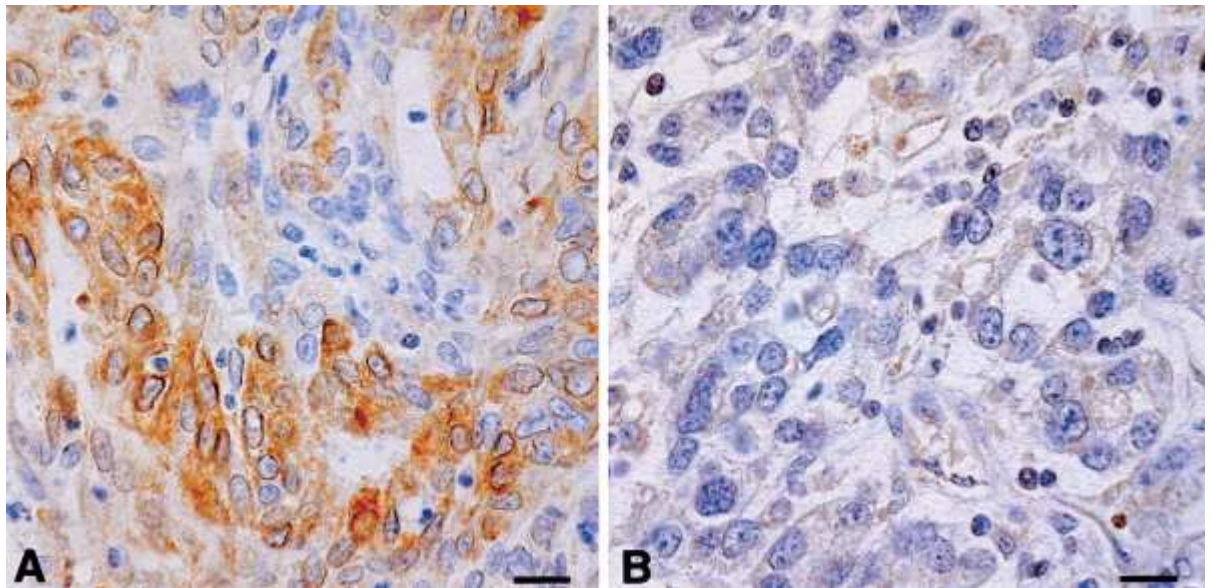


FIGURE 1. Cyclooxygenase-2 (COX-2) immunostaining in primary endometrial carcinoma. (A) COX-2–positive tumor showing intense cytoplasmic immunoreactions in tumor cells. (B) COX-2–negative tumor showing only weak COX-2 staining. Bar = 15 μ m.

RESULTS

COX-2 Immunostaining

COX-2 immunostaining was observed mainly in the cytoplasm of tumor cells. Figure 1 shows a representative example of an endometrial tumor with intense COX-2 immunostaining (Fig. 1A) and a tumor with a very low percentage of COX-2–stained tumor cells (Fig. 1B). Stromal lymphoid cells sometimes showed variable intensities of COX-2 immunoreaction. In the whole series, the proportion of stained cells ranged from 0% to 80% with a mean \pm SE value of 21.2 ± 3.21 . According to the cutoff value, 27 cases (39.1%) were scored as COX-2 positive.

Correlation with Clinicopathologic Parameters

Table 1 shows the distribution of COX-2 positivity, as well as the percentage of COX-2-immunostained cells, according to clinicopathologic characteristics in the overall population. COX-2 positivity was not distributed differently according to age at diagnosis. The percentage of COX-2 positivity was higher (64.0%) in endometrial carcinoma with cervical or extrauterine involvement with respect to tumors limited to the corpus (28.0%). However, we did not find a graded increase of COX-2 positivity according to increasing stage of disease, probably because of the limited number of cases after subgrouping.

COX-2 positivity may not be distributed differently according to histotype, although these results have to be considered with caution due to the low prevalence of special histotype tumors. There was a direct association between grade of differentiation and COX-2 immunostaining, with COX-2 positivity increasing from Grade 1 (16.0%) to Grade 2 (42.0%), to Grade 3 (60.0%) endometrial carcinoma. Interestingly, considering early FIGO stage patients ($n = 62$), the percentage of COX-2 positivity was higher in cases with deep myometrial invasion (67%) than in cases without or less than 50% myometrial invasion (16%). Similar results were found among Stage I patients ($n = 50$), with COX-2 positivity found in 56.2% of cases with greater than 50% myometrial invasion with respect to 13.3% of cases with less than 50% myometrial invasion (data not shown). No association between COX-2

and lymph node status was found, although these results have to be considered with caution given the few patients in the subgroups.

Table 1 also shows the association between the percentage of COX-2–stained cells according to clinicopathologic parameters. No association was found with age at diagnosis. A higher percentage of COX-2–stained cells was observed in tumors with cervical or extrauterine involvement and in cases with deep myometrial invasion. In addition, a progressive increase in the percentage of COX-2–stained cells according to grade of differentiation was found. The proportion of COX-2–stained cells may not be different according to histotype and lymph node status.

DISCUSSION

We reported that COX-2 is expressed in a high percentage of a large series of primary endometrial tumors and its expression may be associated closely with parameters of tumor aggressiveness. COX-2 is overexpressed in endometrial carcinoma cells compared with its expression in normal endometrial cells,^{19,20,25} yet preliminary data concerning COX-2 expression in endometrial hyperplasia are conflicting.^{19,25} The progressive increase in COX-2 expression from normal epithelium through preneoplastic lesions to carcinoma has been observed in other epithelial tissues, suggesting that up-regulation of COX-2 expression may play a role in tumor onset and progression.^{13,26–28} Although the mechanism of COX-2 upregulation is unknown, recent studies suggest that it may result from the deregulation of key steps in the epidermal growth factor receptor signaling pathways,

including the *ras* oncogene^{29,30} whose overexpression has been detected in endometrial tumors.³¹

We showed that poorly differentiated endometrial carcinomas are more frequently COX-2 positive than moderately/well differentiated ones. These results confirm previous findings reported for endometrial²⁵ and prostate tumors¹³ and suggest that COX-2 overexpression could identify more aggressive endometrial carcinomas.

COX-2-positive immunoreaction was found more frequently in tumors with cervical or extrauterine involvement with respect to tumors limited to the uterine corpus, indicating that COX-2 expression may be related to local tumor spread as confirmed by our results in cervical carcinoma patients¹⁶ and previous observations in other tumors.^{15,32,33} The association between COX-2 overexpression and tumor spread could be supported by increased COX-2-mediated invasive ability. In particular, we reported a higher percentage of COX-2 positivity in endometrial carcinomas invading greater than 50% of myometrial thickness compared with tumors confined to the inner half of the myometrium. In this context, the observation that COX-2 overexpression in colorectal tumor cells is associated with an increase in invasive potential due to the ability of COX-2 to modulate adhesion molecule and protease expression^{9,10} is of utmost importance.

Conflicting data have been reported about the association between COX-2 expression and lymph node and/or distant metastases in solid tumors.³²⁻³⁴ Although the sample size of cases with known pathologic lymph

node status was too small to allow definitive conclusions to be drawn, there seems to be no association between COX-2 immunostaining and pathologic lymph node involvement, as was also observed in cervical tumors.¹⁶ Our data suggest that in endometrial and cervical carcinomas, COX-2 may be more involved in local tumor spread than in the metastatic process. Therefore, the assessment of factors influencing tumor–host interaction, like lymphoid infiltrate, markers of extracellular matrix degradation, and neoangiogenesis, could be of interest.

The negative prognostic significance of COX-2 has been demonstrated in several human malignancies.^{14,16,33–35} COX-2 overexpression may be predictive of a poor response to treatment in patients with cervical carcinoma.¹⁶

REFERENCES

1. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA*. 1996;46:5–27.
2. Hoskins WJ, Perez CA, Young RC. Principles and practice of gynecologic oncology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000:1005–1007.
3. Pettersson F. Annual report on the results of treatment in gynecologic cancer. Stockholm: FIGO, 1988.
4. Bur ME, Perlman C, Edelmann L, Fey E, Rose PG. p53 expression in neoplasms of the uterine corpus. *Am J Clin Pathol*. 1992;98:81–87.
5. Susini T, Baldi F, Howard CM, et al. Expression of the retinoblastoma-related gene Rb2/p130 correlates with clinical outcome in endometrial cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16: 1085–1093.
6. Fiumicino S, Ercoli A, Ferrandina G, et al. Microsatellite instability is an independent indicator of recurrence in sporadic stage I-II endometrial adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2001;19:1008–1014.
7. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 1993;53:5100–5103.

8. Williams CS, DuBois RN. Prostaglandins endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol.* 1996;270:G393–G400.
9. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell.* 1995;83:493–501.
10. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3336–3340.
11. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 regulates angiogenesis induced by colon cancer cells [published erratum appears in *Cell* 1998; 94(2): following 271]. *Cell.* 1998;93:705–716.
12. Huang M, Stolina M, Sharma S, et al. Non small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.* 1998;58:1208–1216.
13. Madaan S, Abel PD, Chaudhari KS, et al. Cytoplasmic induction and overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. *Br J Urol.* 2000;86:736–741.
14. Tomozawa S, Tsuno NH, Sunamio E, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumor recurrence, especially haematogenous metastasis of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2000;83:324–328.
15. Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, et al. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase 2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer.* 2001;91:1876–1881.
16. Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, et al. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *J Clin Oncol.* (in press).
17. Karnes WE Jr., Shattuck-Brandt R, Burgart LJ, et al. Reduced COX-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair. *Cancer Res.* 1998;58:5473–5477.
18. Yanamoto H, Itoh F, Fukushima H, Hinoda Y, Imai K. Overexpression of cyclooxygenase-2 protein is less frequent in gastric cancers with microsatellite instability. *Int J Cancer.* 1999;84:400–403.
19. Comerci JT, Sloan C, Edwards RP, Makhia SK, Krohn M, Hatton F. Cyclooxygenase-2 expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia, and carcinoma. *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncology*, Nashville, Tennessee, March 3–7, 2000, Abstract 108.
20. Tong BJ, Tan J, Tajeda L, et al. Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- δ in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia.* 2000;2: 483–490.
21. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457–481.

22. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50:163–170.
23. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using “optimal” cut points in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:829–835.
24. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc.* 1972;34:197–220.
25. Einstein MH, Cao QJ, Weiss H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer in vivo. *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncology*, Nashville, Tennessee, March 3–7, 2000, Abstract 109.
26. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett’s esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998;58:2929–2934.
27. Chapple KS, Cartwright EJ, Hawcroft G, et al. Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 2000;156:545–553.
28. Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal- type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7: 1923–1931.
29. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:429–434.
30. Sheng H, Shao J, DuBois RN. K-ras-mediated increase in cyclooxygenase-2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B1. *Cancer Res.* 2001;61:2670–2675.
31. Scambia G, Catozzi L, Benedetti-Panici P, et al. Expression of ras p21 oncoprotein in normal and neoplastic human endometrium. *Gynecol Oncol.* 1993;50:339–346.
32. Ryu HS, Chang KH, Yang HW, Kim MS, Kwan HC, Oh KS. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Gynecol Oncol.* 2000;76:320–325.
33. Sheehan KM, Sheahan K, O’Donoghue DP, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *J Am Med Assoc.* 1999;282:1254–1257.
34. Murata H, Kawano S, Tsujii S, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:451–455.
35. Gaffney DK, Holden J, Davies M, Zempolich K, Murphy KJ, Dodson M. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;49: 1213–1217.
36. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, et al. A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1995;55:5545–5547.

37. Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59:462–466.
38. Parsons R, Myeroff L, Liu B, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor – type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995;55: 5548–5550.
39. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med.* 2000;342:1946–1952.

II linea di ricerca:“Valutazione dell’espressione di β catenina nel carcinoma dell’endometrio, nella iperplasia endometriale e nell’endometrio normale.

Scopo della ricerca

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l’espressione di β catenina nel carcinoma dell’endometrio, nell’iperplasia endometriale e nell’endometrio normale.

MATERIALI E METODI

Pazienti

a)Gruppo di studio

E’ costituito dalle stesse pazienti reclutate per il primo studio cioè da 75 donne con diagnosi istologica di carcinoma dell’endometrio le cui caratteristiche sono riassunte nella tabella 5.

b)Gruppo di controllo

Il nostro gruppo di controllo è costituito dallo stesso gruppo di controllo dello studio precedente, cioè da 85 pazienti (età media: 55aa) con diagnosi istologica di patologia endometriale benigna. Le caratteristiche principali delle pazienti sono riportate nella tabella 6.

INTERVENTI

-Immunoistochimica

I campioni di tessuto sono stati ottenuti da biopsia su pezzo operatorio nelle pazienti con carcinoma dell'endometrio e da biopsia isteroscopica per il gruppo di controllo.

I campioni sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina in accordo con le procedure standard.

Sezioni di 4 micron di porzioni rappresentative di ogni caso sono state deparaffinizzate in xylene, reidratate, trattate con 0.3% di H₂O₂ in metanolo per 10 minuti per bloccare l'attività perossidasi endogena, e soggette a recupero degli epitopi con induzione di calore in forno a microonde utilizzando la ChemMate

detection kit (Dako, Glostrup, Denmark) in accordo con le istruzioni del fornitore. Le sezioni di tutti i casi studiati sono state processate simultaneamente per immunoistochimica su sistema automatizzato TechMate Horizon (Dako) utilizzando il kit di perossidasi Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La biotina endogena è stata saturata mediante il kit di bloccaggio-biotina (Vector). Le sezioni sono state poste in incubazione con siero normale di coniglio per 15 minuti e dopo con antisiero policlonale di coniglio contro la COX-2 umana (Cayman, Ann Arbor) diluito a 1:300 per un'ora. I controlli negativi sono stati effettuati utilizzando siero di coniglio non immunizzato. I controlli positivi noti sono stati sempre eseguiti durante la procedura.

Quantificazione immunoistochimica

I campioni sono stati analizzati senza conoscere in precedenza le caratteristiche cliniche e biologiche.

E' stato assegnato un punteggio alle cellule marcate. La conta cellulare nei tumori è stata effettuata scegliendo cinque 20x campi da ogni sezione di tessuto così da rappresentare al meglio la

marcatura immunoistochimica del campione del tessuto sul vetrino.

I campi sono stati acquisiti con una fotocamera digitale Nikon Coolpix 950.

Entrambe le cellule immunomarcate e negative sono state contate su una griglia di 0.0225 mm^2 .

La conta delle cellule è stata effettuata due volte per ogni immagine digitale muovendo la griglia sopra le aree rappresentative. La percentuale di cellule immunomarcate è stata calcolata con una conta cellulare media di due aree della griglia per cinque 20 x campi.

L'analisi statistica dei dati è attualmente in corso.

Elettroforesi di proteine in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)

.1 Preparazione dei campioni

L'analisi dell'espressione delle proteine è stata effettuata su aliquote di lisato cellulare dopo lisi dei tessuti con buffer opportuno e centrifugazione per 30 minuti a 4°C alla velocità di

14000 rpm, al fine di recuperare, nel sovranatante, le proteine espresse nella linea cellulare considerata.

Le proteine così ottenute sono state quantizzate con un saggio Bradford (BIORAD) che consiste nel determinare la concentrazione proteica mediante spettrofotometria con l'utilizzo di una curva di taratura di riferimento che si effettua con preparazione di campioni a concentrazione nota di BSA (Albumina di siero bovino 1 µg/ml, Sigma-Aldrich). La lettura dell'assorbanza è stata eseguita ad una lunghezza d'onda di 595 nm. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide è stata condotta su 50µg di proteine estratte dalle colture cellulari analizzate. Per preparare i campioni da caricare su gel di poliacrilammide, un'appropriata quantità di tampone Laemmli (Laemmli, 1970) viene aggiunta ad una aliquota di sovrinatante ed i campioni vengono poi riscaldati a 99°C per 5 minuti.

2 Corsa elettroforetica

I campioni preparati vengono caricati su gel di poliacrilammide alla percentuale opportuna. Per proteine di basso peso molecolare (minore o uguale a 40 KDalton) si usa un gel al 12.5%, per

proteine ad alto peso molecolare (maggiore di 80 KDalton) si prepara un gel al 7.5% (acrilammide x % p/v, bisacrilammide 0.04% p/v, TrisHCl 0.4 M pH 9.2, SDS 0.1% p/v, APS 0.1% p/v, TEMED 0.001% v/v). La corsa elettroforetica è condotta in tampone Tris-glicina/SDS 0.1 M a pH 8.3 ad una intensità di corrente di 25 mA. Su ciascun gel è caricata anche una miscela di proteine che funge da marcatore di peso molecolare.

3. Immunoblot di β -catenina

L'*elettroblot* consiste nel trasferimento del pattern elettroforetico delle singole proteine separate mediante SDS-PAGE su una membrana di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell) nell'apparato Trans-Blot (BIORAD). La membrana, equilibrata con un tampone Tris-glicina, viene messa in contatto con il gel in una apposita cassetta che viene poi immersa in una soluzione contenente Tris-glicina (100 ml), metanolo (200 ml) e H₂O (700 ml). La corrente applicata garantisce il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana utilizzando un voltaggio costante di 100 V per 60

minuti o un amperaggio di 150 mA per tutta la notte a 4°C e sotto agitazione.

Le proteine trasferite possono essere sottoposte ad ulteriori analisi. Si controlla il trasferimento avvenuto mediante la colorazione della membrana di nitrocellulosa con *Rosso Ponceau*, e si procede con esperimenti di immunorivelazione.

Nella fase successiva al trasferimento, la membrana viene incubata per 1 ora prima in una soluzione di *blocking* (TBS-BSA(5%)-Rosso Fenolo o 5% *non fat dry milk* sciolto in TBS (Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 0.15 M) utile a minimizzare le interazioni aspecifiche saturando i siti di legame disponibili, e poi in una soluzione di antisiero (anticorpo primario) diluita in modo opportuno, per esempio 1 - 3 µg/ml, nello stesso tipo di soluzione utilizzata per il blocking (i protocolli relativi hanno consigliato le migliori condizioni di utilizzo). Dopo successivi tre lavaggi in TTBS 1x (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.15 M, 0.05% Tween) la membrana è stata incubata per 1 ora in una soluzione contenente l'anticorpo secondario (se ne utilizzano differenti in dipendenza dalla specie dalla quale è stato estratto l'anticorpo primario) in 5% *non fat dry milk* alla diluizione richiesta. Si effettua un ulteriore e

accurato lavaggio del filtro, che è quindi pronto per la fase di rivelazione. Gli anticorpi secondari sono accoppiati alla perossidasi di rafano. Per la rivelazione, la membrana è stata incubata per 2 minuti con le due soluzioni di rivelazione (H_2O_2 e luminolo) in rapporto 1:1. La perossidasi di rafano, in presenza di H_2O_2 , catalizza l'emissione di luce tramite ossidazione del substrato organico (luminolo). Il kit utilizzato per la reazione di chemioluminescenza è della PerkinElmer Life Science, Inc. A questo punto la membrana è stata sottoposta ad esposizione autoradiografica per diversi tempi, a seconda dell'intensità del segnale atteso, e la lastra impressionata è stata sviluppata mediante immersione, in camera oscura, nel liquido di sviluppo.

4. Anticorpi utilizzati

Gli anticorpi utilizzati sono stati: anti-B-catenina (610153), fornito da Becton Dickinson (BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Germania) ed anti-tubulina (T9036) dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

RISULTATI

Immunoistochimica β -catenina

Delle 75 pazienti con carcinoma dell'endometrio 30 (40%) presentavano un incremento β -catenina nucleare.

Delle 85 pazienti del gruppo di controllo (50 con endometrio normale e 35 con iperplasia), 5 pazienti (5%) con endometrio normale presentavano un'aumentata espressione di β -catenina nucleare e 7 pazienti (20%) con iperplasia presentavano un'aumentata espressione di β -catenina nucleare

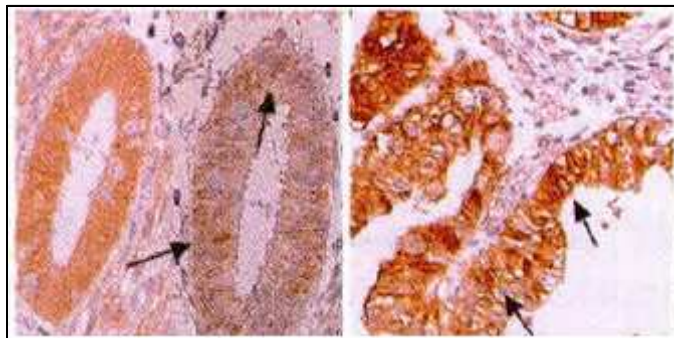
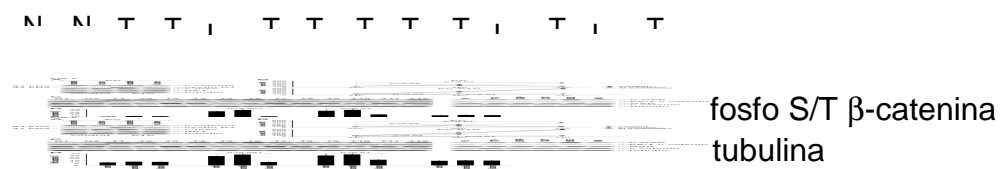


FIGURA 7 *Immunoistochimica β -catenina. Le cellule tumorali mostrano un'intensa positività per β -catenina a livello nucleare.*

Western blot di β -catenina

L'analisi mediante Western blot di beta catenina ha evidenziato una riduzione della quota di β -catenina in forma fosforilata nei tumori rispetto ai gruppi di controllo (carcinoma dell'endometrio vs patologia endometriale benigna).



Livelli di fosforilazione di beta catenina in tessuti normali, in iperplasie e cancri dell'endometrio

I dati anche se interessanti, risultano ancora esigui. Saranno necessari ulteriori studi al fine di chiarire in che modo l'aumentata espressione di β -catenina può in qualche modo intervenire nei meccanismi di carcinogenesi del carcinoma dell'endometrio.

DISCUSSIONE

Abbiamo osservato che l'espressione di COX2 è aumentata in una larga percentuale di carcinoma dell'endometrio e che tale espressione può essere associato con alcune caratteristiche clinico-patologiche del tumore.

COX2 è overespressa nelle cellule di carcinoma endometriale in accordo a quanto riportato in altri dati della letteratura.(57,58,59)

La overespressione di COX2 nell'iperplasia è ancora un dato da verificare.(57,58)

D'altra parte il progressivo aumento nell'espressione di COX2 da epitelio normale alle lesioni precancerose fino al carcinoma è stato osservato in altri tumori epiteliali, il che suggerirebbe un ruolo di COX2 nello sviluppo e nella progressione tumorale.

Non si conoscono ancora bene quali siano i meccanismi con i quali ciò si verifica.

Abbiamo osservato che la positività di COX2 è maggiore nei tumori dell'endometrio a bassa differenziazione rispetto a quelli moderatamente e ben differenziati.

Questi risultato confermerebbero ciò che è stato riportato già precedentemente in letteratura riguardo al carcinoma dell'endometrio e della prostata, suggerendo che la maggiore positività a COX2 può identificare una maggiore aggressività del tumore.(60) La positività a COX2 inoltre è risultata maggiore nei tumori con coinvolgimento cervicale o extrauterino rispetto a quelli limitati al corpo dell'utero così come è risultata maggiore nei tumori dell'endometrio con coinvolgimento del miometrio superiore al 50% rispetto a quelli con coinvolgimento dell'endometrio inferiori al 50%.

Ciò risulta essere in contrasto con la maggior parte dei dati presenti in letteratura.(54)

Cao et al (54) hanno infatti osservato che l'espressione di COX2 è aumentata in maniera significativa sia nei carcinomi moderatamente differenziati sia in quelli scarsamente differenziati.

Joet et al.(54) hanno sottolineato che la positività di COX2 non era associata in maniera significativa con alcuna caratteristica clinico-

patologica (stadio FIGO, grading, grado di inasione miometriale, metastasi linfonodali).

Lo stesso è stato osservato da Fujwaki et al.(54)

I nostri dati concordano al contrario con i dati di Ferrandina et al.(54) che hanno riscontrato che la positività di COX2 è maggiore nei tumori scarsamente differenziati rispetto a quelli moderatamente e ben differenziati. D'altra parte è stato anche osservato che i tumori dell'endometrio con invasione miometriale superiore al 50% presentano una più elevata espressione di COX2 rispetto a quelli con invasione miometriale inferiore al 50%. Non è stata dimostrata alcuna correlazione tra il coinvolgimento linfonodale e i livelli di positività di COX2.

In questo studio abbiamo inoltre osservato che l'espressione di β -catenina nucleare è maggiore nei carcinomi dell'endometrio rispetto all'iperplasia e all'endometrio normale così come nel carcinoma dell'endometrio rispetto all'iperplasia e all'endometrio normale vi è una contemporanea diminuzione della fosforilazione di beta catenina. Ciò comporterebbe un aumento della quota di beta catenina attiva, responsabile a sua volta della attivazione di alcuni geni coinvolti nella proliferazione cellulare.

L'osservazioni che nel carcinoma dell'endometrio vi è in contemporanea un aumento dell'espressione di COX2 di β -catenina nucleare farebbe supporre, in analogia a quanto si verifica nel cancro del colon, che l'aumento di COX2 potrebbe costituire un primo step dei meccanismi di carcinogenesi del tumore dell'endometrio potenziando il pathway di beta catenina. I dati a riguardo non sono però ancora sufficienti.

In definitiva, possiamo affermare che sono necessari ulteriori studi su un più ampio numero di pazienti per chiarire in che modo le COX2 intervengono nell'eziopatogenesi del cancro dell'endometrio.

Il dato in esame, comunque, suggerisce l'utilizzo di inibitori selettivi di COX2 come nuovo approccio terapeutico del cancro dell'endometrio.

Bibliografia

1. Landis SH, Murray T, Golden S, Wingo PA. Cancer Statistics,1999. Cancer Stat 1999;49:8-31.
2. Parkin Dm, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Yound J. Cancer incidence in five continents, vol. 7. Lyon:IARC; 1997.
3. Emons G, Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W. Hormonal interactions in endometrial cancer. Endocr Relat Cancer 2000; 7:227-242.
4. Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. Mod Pathol 2000;13:295-308.
5. Brinton LA, Berman ML, Mortel R et al. Reproductive, menstrual. And medical risk factors for endometrial cancer:results from a case-control study. Am J Obstet Gynecol 1992;167:1317-25.
6. Henderson BE, Casagrande Jt, Pike MC, Mack T, Rosario I, Duke A. The epidemiology of endometrial cancer in young women. Br J Cancer 1983; 47: 749-56.
7. Parslov M, Lidegaard O, Klintorp S, et al. Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study. Am J Obstet Gynecol 20000; 182: 23-9.
8. Lambe M, Wu J, Weiderpass E, Hsieh CC. Childbearing at older age and endometrial cancer risk (Sweden). Cancer Causes Control 1999; 10:43-9.

9. Jafari K, Javaheri G. Endometrial adenocarcinoma and the Stein-Leventhal syndrome. *Obstet Gynecol* 1978; 51:97-100.
10. Gusberg SB, Hall RE. Precursors of corpus cancer.III. The appearance of cancer of the endometrium in estrogenically conditioned patients. *Obstet Gynecol* 1961;17:397-412.
11. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk:a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1995; 85:304-13.
12. Weiderpass E, Adami HO, Baron JA, et al. Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1131-7.
13. Cushing KL, Weiss NS, Voigt LF, McKnight B, Beresford SA. Risk of endometrial cancer in relation to use low -dose, unopposed estrogens. *Obstet Gynecol* 1998; 91:35-9.
14. Hulka BS, Fowler Jr WC, Kaufmann DG, et al. Estrogen and endometrial cancer: cases and two control groups from North Carolina. *AM J Obstet Gynecol* 1988;137:92-101.
15. Shapiro S, Kelly JP, Rosenberg L, et al. Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. *N Engl J Med* 1985; 313:969-72.
16. Tseng L, Gurpide E. Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41:402-4.

17. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL , et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 2002; 288:321-33.
18. Weiderpass E, Adami HO, Baron JA, Magnusson C, Lindgren A, Persson I. Use of oral contraceptive and endometrial cancer risk (Sweden). Cancer Causes Control 1999;10:277-84.
19. Hulka BS, Chambless LE, Kaufman DG, Fowler Jr WC, Greenberg BG. Protection against endometrial carcinoma by combination- product oral contraceptives. JAMA 1982;247 :475-7.
20. Voigt LF, Deng Q, Weiss NS. Recency, duration, and progestin content of oral contraceptives in relation to the incidence of endometrial cancer (Washington, USA). Cancer Causes Control 1994; 5:227-33.
21. Goodman MT, Hankin JH, Wilkens LR, et al. Diet, Body size, Physical activity, and the risk of endometrial cancer. Cancer Res 1997; 57:5077-85.
22. Schapira DV, Kumar NB, Lyman GH, Cavanagh D, Roberts WS, LaPolla J. Upper- body fat distribution and endometrial cancer risk. JAMA 1991;266:1808-11.
23. Tornberg SA, Carstensen JN. Relationship between Quetelet's index and cancer of breast and female genital

- tract in 47,000 women followed for 25 years. *Br J Cancer* 1994;69:358-61.
24. Austin H, Austin Jr JM, Partridge EE, Hatch KD, Shingleton HM. Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution. *Cancer Res* 1991;51:568-72.
 25. Enriori CL, Reforzo Membrives J. Peripheral aromatization as a risk factor for breast and endometrial cancer in postmenopausal women: a review. *Gynecol Oncol* 1984; 17:1-21.
 26. Davidson BJ, Gambone JC, Lagasse LD, et al. Free estradiol in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *J Clin Endocrin Metab* 1981; 52:404-8.
 27. Elliott EA, Matanoski GM, Rosenshein NB, Grumbine FC, Diamond EL. Body fat patterning in women with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1990; 39:253-8.
 28. Parazzini F, La vecchia C, Negro E, Moron S, Chatenoud L. Smoking and risk eof endometrial cancer: results from an italian case- control study. *Gynecol Oncol* 1995;56:195-9.
 29. Stockwell HG, Lyman GH. Cigarette smoking and the risk of female reproductive cancer. *Am J Obste Gynecol* 1987; 157:35-40.
 30. Levi F, La vecchia C, Gulie C, Franceschi S, Negro E. Oestrogen replacement treatment and risk of endometrial cancer: an assessment of the role of covariates. *Eur J Cancer* 1993; 29a:1445-9.

- 31.Terry PD, Rohan TE, Franceschi S, Weiderpass E. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer. *Lancet Oncol* 2002;3: 470-80.
- 32.Baron JA, Comi RJ, Cryns V, Brinck Johnsen T, Mencer NG. The effect of cigarette smoking on adrenal cortical hormones. *J Farmacol Exp Ther* 1995;272:151-5.
- 33.Franks AL, Kendrick JS, Tyler jr CW. Postmenopausal smoking, estrogen replacement therapy, and the risk of endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:20-3.
- 34.Levi F, Franceschi F, Negro E, La vecchia C. Dietary factors and the risk of endometrial cancer. *Cancer* 1993;71:3575-81.
- 35.Katsouyanni K, Boyle P, Trichopoulos D. Diet and urine estrogens among postmenopausal women. *Oncology* 1991;48:490-4.
- 36.Kalandidi A, Tzonou A, Lipworth L, Gamatsi I, Filippa D, Trichopoulos D. A case- control study of endometrial cancer in relation to reproductive somatometric and life-style variables. *Oncology* 1996;53:354-9.
- 37.Terry P, Baron JA, Weiderpass E, Yun J, Lichtstein P, Nyren O. Life style and endometrial cancer risk: a cohort study from the Swedish Twin Registry. *Int J Cancer* 1999;82:38-42.
- 38.Parazzini F, La vecchia C, D'Avanzo B, Moron S, Chatenoud L, Ricci E. Alcohol and endometrial cancer risk:

- findings from an italian case- control study. *Nutr Cancer* 1995; 23:55-62.
- 39.Cauley JA, Gutai JP, Kuller LH, LeDonne D, Powell JG. The epidemiology of serum sex hormones in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1989; 129:1120-31.
 - 40.Levi F, La vecchia C, Negro E, Franceschi S. Selected phisycal activities and the risk of endometrial cancer. *Br J Cancer*1993;67:846-51.
 - 41.Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Jass JR, Green JS, Nomizu T, et al. The epidemiology endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994;14:1675-8.
 - 42.ACOG Committee Opinion .Tamoxifen and endometrial cancer. *Int J Gynecol Obstet* 1996;53:197-9.
 - 43.Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rew* 2000;17:40-54.
 - 44.Bai Mk, Costopoulos JS, Christoforidou BP, Papadimitriou CS. Immunohistochemical detection of the c- myc oncogene product in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium. *Oncology* 1994;51:314-9.
 - 45.Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, et al. Altered PTEN expression as diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.*2000; 92:924-31.

- 46.Sivridis E, Fox H, Buckley H. Endometrial carcinoma: two o three entites? Int J Gynecol Cancer 1998;8:183-8.
- 47.Sarode VR, Rader AE, Rose PG, Rodriguez M, Abdul-Karim FW. Significance of cytologically normal endometrial cells in cervical smears from postmenopausal women. Acta Cytol 2001;45:153-6.
- 48.Pescetto G, De Cecco L, Pecorari, et al. Ginecologia e Ostetricia. Roma: Società Editrice Universo 2001.
- 49.Baronow RC.Endometrial cancer, not a benign disease. Obste Gynecol 1976;47:630-34.
- 50.Boronow RC, Marraw CP, Creasman WT, Di Saia PJ, Silvberg SG, Miller A, et al.Surgical staging in endometrial cancer: clinical –pathologic findings in a prospective study. Obstet Gynecol 1984;63:825-32.
- 51.Wilson TO, Podratz KC, Gaffey TA, Malkasian GD, O'Brien PC, Naessen JM. Evaluation of unfavourable histologic subtypes in endometrial adenocarcinoma. Am J Obstet Gynecol 1990;162:418-26.
- 52.FIGO news. Corpus cancer staging. Int J Gynecol Obstet 1989; 28:190.
- 53.Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A gynaecologic Oncology Group study. Cancer 1987;60:2035-41.
- 54.Ohono S, Ohono Y, Suzuki N, Inagawa H, Kohchi C, Ichiro Soma G, Inoue M. Multiple role of Cyclooxygenase-2 in

- endometrial cancer. *Anticancer Reserch* 2005; 25:3679-3688.
55. Jonathan L, Hecht and George L. Mutter. Molecular and Pathologic Aspects of endometriale Carcinogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24:4783-4791.
56. Hsien-Chang S, Tanri S, Tsutomu M, Hiroyasu K, Yu-Zhen F, Miyuki K, Ikuo K. Immunohistochemical Expression of E- cadherin and B-catenin in the Normal and Malignant Human Endometrium: An Inverse correlation between E-cadherin and nuclear B catenin expression. *Anticancer Reserch* 2004. 24: 3843-3850.
57. Comerci JT, Sloan C, Edwards RP, Makhaia SK, Krohn M, Hatem F. Cyclooxygenase-2 expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia, and carcinoma. *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of Society of Gynecologic Oncology, Nashville, Tennessee, March3-7 2000, Abstract 108.*
58. Tong BJ, Tan J, Tajeda L, et al. Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferators-activated receptor- δ in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia*.2000; 2: 483-490.
59. Einstein MH, Cao QJ, Weiss H et al. Expression of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer in vivo. *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of Society of Gynecologic Oncology, Nashville, Tennessee, March3-7 2000, Abstract 109.*

- 60.Madaan S, Abel PD, Chaudhari KS, et al. Cytoplasmic induction and overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. Br J Urol.2000; 86:736-741.
- 61.Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase- 2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas.Cancer Reserch.1998. 58: 2929-2934.
- 62.Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B et al. Expression of cyclooxygenase-2 dysplasia of stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. Clin Cancer REs. 2001; 7:429-434.